

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDES DES EFFETS TOXIQUES DES IONS MÉTALLIQUES DU CADMIUM
SUR LA FORMATION ET L'ACTIVITÉ DES PHOTOSYSTÈMES CHEZ L'ALGUE
UNICELLULAIRE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MICHEL VINCENT

AOÛT 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier le Dr Radovan Popovic, professeur au département de chimie et Directeur du TOXEN, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné un soutien continu. De plus, il a cru en mes idées en plus de favoriser mon développement et ma formation scientifique.

Merci à mes parents de m'avoir soutenu tout au long de mes études et de m'avoir inculqué, dès mon jeune âge, les valeurs qui guident mes décisions et mes actes aujourd'hui.

Merci à toute l'équipe d'étudiants du laboratoire, car sans vos idées et les discussions, le travail aurait été long et laborieux. Donc, merci David pour tous tes conseils et pour avoir été à l'écoute dès ma première journée jusqu'à la dernière. Merci Dragan d'avoir partagé ton expertise et tes connaissances sur la fluorescence, ce fût grandement apprécié. Merci Charles, en plus d'être un bon ami, tu es une source d'inspiration et ce fût un plaisir d'avoir été à tes côtés depuis plusieurs années. Finalement, je remercie Nadia pour les discussions et le temps agréable passé ensemble au laboratoire.

De plus, les échanges entre les différents laboratoires aident grandement au développement scientifique et social. J'en profite donc pour remercier Denis, Isabelle, Jean-François, Martin, Mathieu, Sara et Sébastien. Un merci tout spécialement à Billy qui a su attirer mon attention sur des sujets biochimiques intéressants en raison de ses nombreuses connaissances. À tous, je souhaite le plus grand succès dans le monde scientifique.

Il serait inadéquat de passer sous silence l'aide dont les étudiants disposent au département de chimie de l'UQAM. Alors je remercie, Denis pour tout son aide et support en cytométrie en flux. Également, les techniciennes Charlotte, Francine et Sylvie pour leurs judicieux conseils. Du côté de l'administration, je remercie Cécile, Danny, Nicole et Odette pour l'attention qu'ils portent à toute la communauté étudiante.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
RÉSUMÉ	xviii
 CHAPITRE I: LA PHOTOSYNTHÈSE.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Les réactions photochimiques.....	1
1.2.1 Le site de la photosynthèse.....	1
1.2.2 L'absorption de la lumière	4
1.2.3 Séparation de charges et dégagement de l'oxygène.....	7
1.2.4 Le transport d'électrons.....	11
1.2.5 Les réactions de la phase obscure.....	14
 CHAPITRE II: LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE.....	16
2.1 Introduction.....	16
2.2 La cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence chlorophyllienne.....	17
2.2.1 Les paramètres de la cinétique rapide	20
2.2.1.1 L'efficacité photochimique maximale du PSII (Φ_{PSII} ou F_v/F_m).....	20
2.2.1.2 Estimation de la taille des antennes collectrices de lumière (ABS/CR)	20
2.2.1.3 Le «quenching» du «pool» de plastoquinones (qPQ).....	20
2.2.1.4 Le «quenching» lié au gradient de protons (qE_{max})	21
2.3 La cinétique de fluorescence modulée.....	21
2.3.1 Les paramètres associés à la cinétique de fluorescence chlorophyllienne modulée	24
2.3.1.1 L'efficacité photochimique maximale du PSII (Φ_M).....	24
2.3.1.2 L'efficacité photochimique opérationnelle du PSII (Φ'_M)	25
2.3.1.3 Le «quenching» photochimique (q_P)	25

2.3.1.4 Le «quenching» non-photochimique (q_N).....	25
CHAPITRE III: LA BIOSYNTHESE DE LA CHLOROPHYLLE	27
3.1 Introduction.....	27
3.2 L'étioplaste et le développement du chloroplaste.....	27
3.3 La synthèse de la chlorophylle.....	29
3.3.1 La voie des tétrapyrroles	29
3.3.2 Les protochlorophyllides	31
3.3.3 L'enzyme POR et son activité.....	31
3.3.4 Les changements spectraux	31
CHAPITRE IV: LE STRESS OXYDATIF	33
4.1 La formation d'espèces réactives de l'oxygène	33
4.2 Les principaux sites de formation	35
4.2.1 La photosynthèse et le stress oxydatif	36
4.3 Les antioxydants	37
4.3.1 La superoxyde dismutase (SOD).....	37
4.3.2 La catalase	38
4.3.3 L'acide ascorbique et l'ascorbate peroxydase	38
4.3.4 Le glutathion.....	39
4.3.5 Les caroténoïdes	41
CHAPITRE V: LA PROBLÉMATIQUE	42
CHAPITRE VI: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	46
6.1 Le matériel biologique	46
6.2 Les effets des ions de cadmium sur la croissance et l'activité photosynthétique	47
6.2.1 Les conditions de culture.....	47
6.2.2 Traitements au chlorure de cadmium ($CdCl_2$).....	48
6.2.3 La cytométrie de flux	49
6.2.4 La fluorescence chlorophyllienne.....	51

6.3 Les effets des ions de cadmium sur la biosynthèse de la chlorophylle et la formation des photosystèmes	52
6.3.1 Les conditions de culture.....	52
6.3.2 Les traitements au chlorure de cadmium.....	55
6.3.3 Détermination des effets du CdCl_2 sur la phototransformation de PChlide	55
CHAPITRE VII: RÉSULTATS & DISCUSSIONS.....	57
7.1 Effets des ions cadmium sur la densité et la viabilité cellulaire	57
7.1.1 Effets inhibiteurs des ions cadmium sur la division cellulaire.....	57
7.1.2 Effet toxique des ions cadmium sur la viabilité cellulaire.....	58
7.1.3 Effet des ions cadmium sur l'induction des groupements thiols intracellulaires.	60
7.1.4 Discussion sur les effets des ions cadmium sur la densité et la viabilité cellulaire	62
7.2 Effets des ions cadmium sur les cinétiques de fluorescence chlorophyllienne.....	64
7.2.1 Les changements des cinétiques rapides en présence des ions cadmium	64
7.2.2 Les paramètres de fluorescence chlorophyllienne comme indicateurs d'effets toxiques des ions de cadmium sur la photochimie du PSII	66
7.2.3 Changements des cinétiques de fluorescence modulée en présence de cadmium	74
7.2.5 Discussion sur les effets des ions cadmium sur les cinétiques de fluorescence chlorophyllienne.....	81
7.3 Effets du cadmium sur la biosynthèse de la chlorophylle et la formation de photosystèmes	89
7.3.1 Effet du cadmium sur l'activité enzymatique de POR	89
7.3.2 Discussion sur les résultats de la photoconversion de PChlide en Chlide	91
7.3.3 Effet du cadmium sur la formation des photosystèmes	93

7.3.4 Discussion sur les effets du cadmium dans la biosynthèse de la chlorophylle.....	96
CHAPITRE VIII: CONCLUSIONS	98
RÉFÉRENCES	100

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Site de la photosynthèse dans la cellule végétale : le chloroplaste et ses structures internes (Tiré de Campbell, 1995).	2
Figure 1.2 Modèle de la structure d'un thylacoïde: les unités protéiques (D'après Lehninger et <i>al.</i> , 1994).	3
Figure 1.3 Structure moléculaire des molécules de (A) chlorophylle et de (B) carotène.	4
Figure 1.4 Spectre d'absorption des différents pigments photosynthétiques (Tiré de Rawn, 1990).	5
Figure 1.5 Les niveaux d'énergie d'une molécule de chlorophylle et ses mécanismes de dissipation (Tiré de Harbinson et Rosenqvist, 2003).	6
Figure 1.6 Transfert de l'énergie entre les molécules de l'antenne collectrice de lumière (Tiré de Campbell, 1995).	7
Figure 1.7 Périodicité du cycle de production d'oxygène (Tiré de Joliot et <i>al.</i> , 1969).	8
Figure 1.8 Schéma de la formation des états d'oxydoréduction (S) et la production de protons pendant l'oxydation de l'eau conduisant au dégagement d'O ₂ (Tiré de Buchanan et <i>al.</i> , 2001).	9
Figure 1.9 Modèle structurel détaillé du centre réactionnel du PSII. (D1 et D2 : protéines dominantes du PSII; Mn : groupement ou «cluster» de manganèse; CP43 et CP47 : protéines liant la chlorophylle; Lhcb 1,2,3,4,5 et 6 : protéines constituant l'antenne collectrice; cyt b559 : cytochrome b559; PQH ₂ : plastoquinone réduite; Q _A = quinone a; Q _B = quinone b; E et	

F sont des protéines formant le cytochrome b559; J,K,W,I,L,S,N,H,M et X sont des sous- unités structurelles du PSII) (Tiré de Rawn, 1990).....	10
Figure 1.10 Niveaux d'énergie du transport linéaire des électrons entre les photosystèmes I et II. (Tyr : Tyr 161; PC : plastocyanine; PQ : plastoquinone; FeS : protéine fer-soufre; Cyt : cytochrome; A ₀ : accepteur initial du photosystème I; A ₁ : phylloquinone; F _X : protéine fer-soufre, F _A et F _B : centres fer-soufre; Fd = ferrédoxine (Tiré de Govindjee et Govindjee, 1974).....	12
Figure 1.11 Reconstitution schématique du transport non cyclique des électrons (I, II, III et IV : sous unités structurelles de la pompe à protons; α , β , δ , ϵ , γ : sous unités protéiques de la pompe à protons) (Tiré de Rawn, 1990).....	12
Figure 1.12 Transport cyclique des électrons (D'après Govindjee et Govindjee, 1974).....	13
Figure 1.13 La fixation du CO ₂ lors du cycle de Calvin (Tiré de Campbell, 1995).	15
Figure 2.1 Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée (Tiré de Müller et <i>al.</i> , 2001).	16
Figure 2.2 Courbes d'induction de fluorescence présentant les différentes transitions (O-I-D-P-S-M-T) sur une échelle croissante de temps (Tiré de Briantais et <i>al.</i> , 1986).	18
Figure 2.3 Courbe d'induction de fluorescence montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique (Tiré de Strasser et Govindjee, 1991).....	19
Figure 2.4 Schéma du fonctionnement d'un fluorimètre modulé (PAM). A = Fluorimètre; D = détecteur (modulé); MR = lumière modulée; AR =	

lumière actinique; SR = Lumière Saturante; FR = lumière rouge lointain; SF et LF = Filtres optiques.....	22
Figure 2.5 Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM. Fo : fluorescence constante pour une plante adaptée à l'obscurité; F'o : fluorescence constante pour une plante adaptée à la lumière; Fv : fluorescence variable; Fm : fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité; F'm : fluorescence maximale pour une plante adaptée à la lumière; q _N : «quenching» non photochimique; q _p : «quenching» photochimique (Tiré de Rohacek, 2002).....	24
Figure 3.1 Microscopie électronique d'un étioplaste. PT : prothylacoïdes et PLB : corps prolamellaires (Tiré de Hooper, 1984).....	28
Figure 3.2 Mécanisme de la biosynthèse de la chlorophylle à partir du glutamate (Tiré de Buchanan, 2001).....	30
Figure 3.3 Les formes de PChlide, de Chlide, de Chl et leur changements spectraux à 77°K lors des étapes du verdissement.	32
Figure 4.1 Formation et dégradation d'ERO induites par les métaux lourds.....	35
Figure 4.2 Sites de formation d'ERO lors de la photosynthèse (d'après McKersie et Leşhem, 1994).....	36
Figure 4.3 Recyclage de l'acide ascorbique (ascorbate) et du glutathion dans le cycle d'Haliwell-Asada.....	40
Figure 6.1 Image microscopique de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	46
Figure 6.2 Réaction moléculaire du CMFDA avec les estérases et les groupements thiols protéiques. L'ordre des réactions peut être inversé.	51

- Figure 6.3 Conditions de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* y-1 : (A) viabilité et degré de réversion du phénotype lorsque cultivé à $0,5 \mu\text{mole de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cercles) et à l'obscurité (triangles); (B) Dilution quotidienne des cellules dans le milieu TAP liquide lorsqu'elles sont cultivées à $0,5 \mu\text{mole de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cercles pleins) et à l'obscurité (cercles vides).....54
- Figure 6.4 Augmentation du ratio PChlide-F633/ Chlide-F678 selon la durée de présence à l'obscurité pour les cellules *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1168 y1). Normalisé à 633 nm.54
- Figure 7.1 Effet toxique du chlorure de cadmium sur la densité cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures (n=3).58
- Figure 7.2 Effet toxique du chlorure de cadmium sur la viabilité cellulaire de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (A) et de type mutante dépourvue de paroi cellulaire (B) après 24 et 48 heures de traitement (n=3).....60
- Figure 7.3 Variation des groupements thiols intracellulaires chez *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (B) en réponse à l'exposition au chlorure de cadmium après 24 et 48 heures de traitement (n=3).62
- Figure 7.4 Changements dans les transitions rapides de la fluorescence chlorophyllienne pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) exposée au chlorure de cadmium pour une durée de A) 24 et B) 48 heures (n=3).....64
- Figure 7.5 Changements dans les transitions rapides de la fluorescence chlorophyllienne pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type mutant

dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) exposée au chlorure de cadmium pour une durée de A) 24 et B) 48 heures (n=3).....	65
Figure 7.6 Effet du cadmium sur le rendement photochimique (ϕ PSII) de l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).....	67
Figure 7.7 Effet du cadmium sur l'absorbance par centre réactionnel du PSII (ABS/CR) de l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de type sauvage (CC-125)(A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400)(B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).....	69
Figure 7.8 Effet du cadmium sur le «quenching» de fluorescence causé par le changement du «pool» de plastoquinones réduites (qPQ) de l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).....	71
Figure 7.9 Effet du cadmium sur le «quenching» de fluorescence associé au gradient de protons (qE_{max}) chez l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).....	73
Figure 7.10 Changements dans les cinétiques de fluorescence modulée pour l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de type sauvage (CC-125) exposée au chlorure de cadmium pendant 24 et 48 heures (Spectres normalisés à F_0)(n=2).	74
Figure 7.11 Changements dans les cinétiques de fluorescence modulée pour l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) exposée au chlorure de cadmium pendant 24 et 48 heures (Spectres normalisés à F_0)(n=2).	75

- Figure 7.12 Effet du cadmium sur le rendement photochimique maximal du PSII (ϕ_M) pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=2).....76
- Figure 7.13 Effet du cadmium sur le rendement photochimique opérationnel maximal du PSII (ϕ'_M) pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=2).....78
- Figure 7.14 Effet du cadmium sur le «quenching» photochimique (q_P) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=2).....79
- Figure 7.15 Effet du cadmium sur le «quenching» non-photochimique (q_N) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=2).....80
- Figure 7.16 Effet du cadmium sur le ratio F_o/F_v chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).....82
- Figure 7.17 Photoconversion de la PChlide en Chlide chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1168 y-1) en présence de (A) 0 et (B) 100 μM d'ions cadmium suite à l'exposition à une lumière de 100 $\mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (normalisé à 633 nm)(n=1).....89

Figure 7.18 Formation de photosystèmes chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1168 y-1) en présence de (A) 0 et (B) 100 μM d'ions cadmium suite à différents temps d'exposition à une lumière de 100 $\mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (normalisé au maxima) (n=1).....94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 6.1 Concentration des nutriments dans le milieu HSM.....	48
Tableau 6.2 Concentrations des nutriments présents dans le milieu TAP.	53
Tableau 7.1 Comparaison de valeurs des paramètres q_P , q_N et $1-q_P$ avec les paramètres relatifs $q_{P(rel)}$, $q_{N(rel)}$ et $UQF_{(rel)}$ ($n=2$).	85
Tableau 7.2 Changements de l'activité enzymatique de POR pour les cellules de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> exposées au cadmium (exprimé selon la fluorescence de Chlide-F677/PChlide-F633).....	90
Tableau 7.3 Variation du maxima de la Chlide-F678 suite à la photoconversion de PChlide en présence d'ions cadmium.	91
Tableau 7.4 Variation du maxima de la bande associée à la formation de la chlorophylle et du PSII.....	95
Tableau 7.5 Changements dans le ratio de la formation du PSI exprimé par F685/F710 associés à la fluorescence de la chlorophylle et du PSI respectivement.	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

δ -ALA : acide δ -aminolévulinique

Φ_{PSII} : Efficacité photochimique du PSII à l'état stationnaire du transport d'électrons

$^1\text{Chl}^*$: Molécule de chlorophylle excitée

$^3\text{Chl}^*$: Molécule de chlorophylle triplet

A_0 : Accepteur initial du PSI (Molécule de chlorophylle *a* du P700)

A_1 : Phylloquinone

ABS : Absorbance

AR : Lumière actinique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CDO : Complexe de dégagement d'oxygène

Chl : Molécule de chlorophylle

Chlide : Chlorophyllide

CMFDA : Chloromethylfluoresceindiacetate

CR : Centre réactionnel

Cyt : Cytochrome

DAS : Échantillon adapté à l'obscurité

DCMU : 3,4-dichlorophényldiméthylurée

DFP : Densité du flux de protons

DMT : Transporteurs de métaux divalents

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

F_A , F_B et F_X : Complexe protéique fer-soufre

Fd : Ferrédoxine

Fd_{red} : Ferrédoxine réductase

FeS : Protéine fer-soufre

F_m : Fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité

F'_m : Fluorescence maximale pour une plante adaptée à la lumière actinique

F_o : Fluorescence constante pour une plante adaptée à l'obscurité

F'o : Fluorescence constante pour une plante adaptée à la lumière actinique
 F_p : Fluorescence au sommet
 FR : Lumière rouge lointain
 F_s : Fluorescence variable au niveau stationnaire
 F_v : Fluorescence variable
 G3P : Glycéraldéhyde 3-phosphate
 GSH : Glutathion réduit
 GSSG : Glutathion oxydé
 HSM : «High Salt Media»
 hν : Énergie lumineuse
 kDa : Kilo Dalton
 LAS : Échantillon adapté à la lumière
 LF : Filtre optique
 LHCI et LHCII : Complexes collecteurs de lumière («Light Harvesting Complexes») du PSI
 et du PSII
 ML-Chl : Complexe métal lourd au centre du pyrole de la chlorophylle
 Mn₄ : Tetramère de Manganèse du complexe de dégagement d'oxygène
 MR : Lumière modulée
 NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 OEC33 : Sous-unité du CDO de 33 kDa
 O-K-J-I-D-P-S-M-T : Transitions de la cinétique de fluorescence
 P₆₈₀ et P₇₀₀ : Centre réactionnel du PSII et PSI
 PAM : Fluorimètre («Pulse amplitude modulator»)
 PC : Plastocyanine
 PChlide : Protochlorophyllide
 Pheo : Molécule de Phéophytine
 PEA : Fluorimètre («Plant efficiency analyser»)
 PEPC : Phosphoénolpyruvate carboxylase
 PGAL : glyceraldéhyde 3-phosphate
 PLB: Corps prolamellaire (Prolamellar bodies)
 POR: Enzyme NADPH-Protochlorophyllide oxydoréductase
 PQ : Plastoquinone

PQH₂ : Plastoquinone réduite

PSI et PSII : Photosystème I et II

PT : Prothylacoïdes

Q_A : Quinone A (Accepteur primaire d'électron du PSII)

Q_B : Quinone B (Accepteur secondaire d'électron du PSII)

qE_{max} : «Quenching» dépendant du gradient de protons

q_I : Composant du «quenching» non photochimique dépendant des photodommages au niveau du PSII

q_N : «Quenching» non photochimique

q_{N(rel)} : «Quenching» non photochimique relatif

q_P : «Quenching» photochimique

q_{P(rel)} : «Quenching» photochimique relatif

qPQ : «Quenching» dépendant du «pool» de plastoquinones

q_T : Composant du «quenching» non photochimique dépendant des états de transitions

RubisCO : Ribulose 1,5-biphosphate-carboxylase / oxygénase

RuBP : Ribulose 1,5-biphosphate

SF : Filtre optique

S_N : État du complexe de dégagement d'oxygène

SR : Lumière saturante

TAP : Milieu de culture Tris-acétate phosphate

Tyr : Tyrosine

UQF_(rel) : «Unquenched» fluorescence relatif

Z : Tyrosine 161 (donneur primaire d'électrons du PSII)

RÉSUMÉ

La pollution des milieux aquatiques par les métaux lourds demande une évaluation du risque des effets toxiques chez des espèces aquatiques. En particulier, le cadmium est connu pour être un métal non essentiel pour le fonctionnement cellulaire et toxique à faible concentration. Environ 25 000 tonnes de cadmium par année sont rejetées dans l'environnement via les activités industrielles, d'extraction de métaux, par l'emploi de pesticides et autres. Dans ce contexte, tant la formation que l'activité de l'appareil photosynthétique représente une cible importante pour les contaminants métalliques parce que l'inhibition des processus biochimiques et biophysiques de la photosynthèse affectent en entier la physiologie des plantes. Dans cette étude, la biosynthèse de la chlorophylle et la fluorescence chlorophyllienne ont été utilisées afin d'évaluer les effets toxiques du cadmium sur la formation de l'appareil photosynthétique et son activité. Dans un premier temps, l'effet toxique du cadmium a été évalué sur l'activité photosynthétique de l'algue verte. Dans cette partie, la fluorescence chlorophyllienne des algues est utilisée comme une approche pour évaluer le risque de toxicité du cadmium. Une altération de la capacité photosynthétique induite par les métaux lourds se reflète dans le rendement et la cinétique de fluorescence. Deux souches de cette espèce, une souche «sauvage» (CC-125 WT mt+) avec paroi cellulaire et une souche «mutante» (CC-400 CW15 mt+) sans paroi, ont été employées pour étudier les effets de la paroi cellulaire sur l'absorption du cadmium et son effet toxique après 24 et 48 heures de traitement. Les courbes dose-réponse obtenues pour ces deux souches ont permis d'identifier une grande sensibilité des effets toxiques du cadmium pour les algues sans paroi par rapport à celles avec paroi en présence d'une même concentration nominale de cadmium. Les paramètres photosynthétiques de fluorescence ont indiqués que le site d'inhibition au cadmium a été au complexe enzymatique du dégagement d'oxygène associé au photosystème II. Dans la seconde partie, afin d'évaluer la capacité à synthétiser la chlorophylle dans un environnement contaminé au cadmium, la phototransformation de la protochlorophyllide (PChlide) en chlorophyllide (Chlide) par l'enzyme protochlorophyllide oxydoréductase (POR) a été étudié chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Une souche mutante ne synthétisant pas la chlorophylle à l'obscurité a du être utilisé afin d'obtenir des cellules étiolées, c'est-à-dire que les chloroplastes de ces cellules ne sont pas encore formés. La fluorescence à basse température (77 °K) est l'outil permettant de suivre dans le temps la phototransformation des pigments et la formation des photosystèmes. Les spectres de fluorescence ont permis d'évaluer un certain retard dans la phototransformation de la protochlorophyllide en chlorophyllide ce qui a une répercussion sur la formation des photosystèmes.

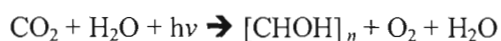
Mots clés : Cadmium, *Chlamydomonas reinhardtii*, chlorophyllide, chlorophylle, cytométrie de flux, fluorescence, métaux lourds, NADPH-protochlorophyllide oxydoréductase, photosynthèse, protochlorophyllide, toxicité.

CHAPITRE I

LA PHOTOSYNTHÈSE

1.1 Introduction

La photosynthèse est le processus métabolique de base de la cellule végétale; elle convertit l'énergie lumineuse ($h\nu$) en énergie chimique qui sera emmagasinée dans les molécules organiques, soit l'ATP et le NADPH qui fournissent respectivement l'énergie et le pouvoir réducteur nécessaire à la formation de glucides. De plus, lors de la photolyse de l'eau, qui sera détaillée plus loin, il y a formation d'oxygène moléculaire (O_2), ce qui mène à la réaction générale suivante :



Cette réaction globale est constituée de deux phases distinctes : la phase lumineuse comprenant les réactions physico-chimiques et la phase obscure qui contient les réactions biochimiques. Lors de la phase lumineuse, il se déroule les réactions photochimiques nécessaires à la formation de l'énergie chimique et du pouvoir réducteur cellulaire (ATP et NADPH) à partir de l'énergie lumineuse. Durant la phase dite obscure, il se déroule les réactions biochimiques menant à la formation de glucides à partir du CO_2 fixé pendant le cycle de Calvin.

1.2 Les réactions photochimiques

1.2.1 Le site de la photosynthèse

L'ensemble des réactions photochimiques et biochimiques se déroulent dans des organites propres aux cellules végétales appelés chloroplastes. Le chloroplaste est formé d'une membrane à double couche lipidique séparant ainsi sa partie interne, nommée stroma et le cytoplasme cellulaire (Figure 1.1). Ce système membranaire permet les échanges gazeux, ioniques et macromoléculaires nécessaires au déroulement de la photosynthèse. L'ensemble des enzymes et des cofacteurs nécessaires durant les réactions biochimiques de la phase

obscur se retrouve dans le stroma du chloroplaste. Pour ce qui est des réactions photochimiques de la photosynthèse, elles s'effectuent à l'intérieur d'un second réseau membranaire du chloroplaste, appelé thylacoïdes (tiré du mot grec thylakos qui signifie un sac ou une poche) qui est riche en complexes pigments-protéines.

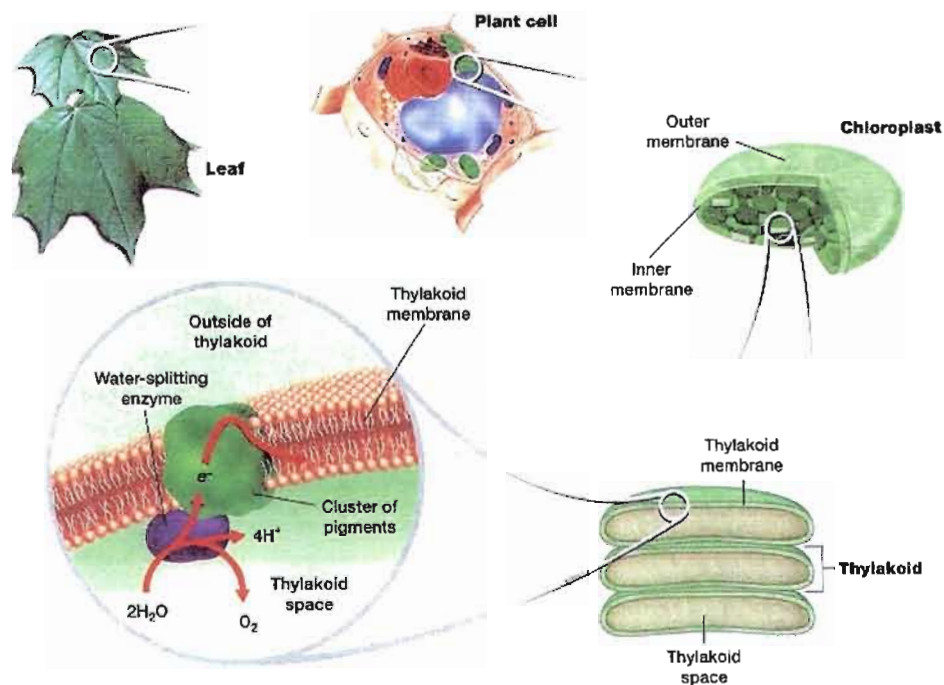


Figure 1.1 Site de la photosynthèse dans la cellule végétale : le chloroplaste et ses structures internes (Tiré de Campbell, 1995).

Les thylacoïdes sont constitués de vésicules aplaties et empilées formant des grana qui sont liés entre eux par des lamelles stromatiques. C'est dans les membranes des thylacoïdes que sont intégrés les cinq types de complexes protéiques impliqués dans la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique via le transport des électrons (Figure 1.2).

Ces cinq complexes protéiques sont :

1. Les antennes collectrices de lumière (LHCI et LHCII)
2. Les centres réactionnels (P680 et P700)

3. Le réseau de transporteurs (Cytochromes et plastocyanines)
4. Le système enzymatique ATP synthétase
5. Le complexe enzymatique du dégagement d'oxygène (CDO)

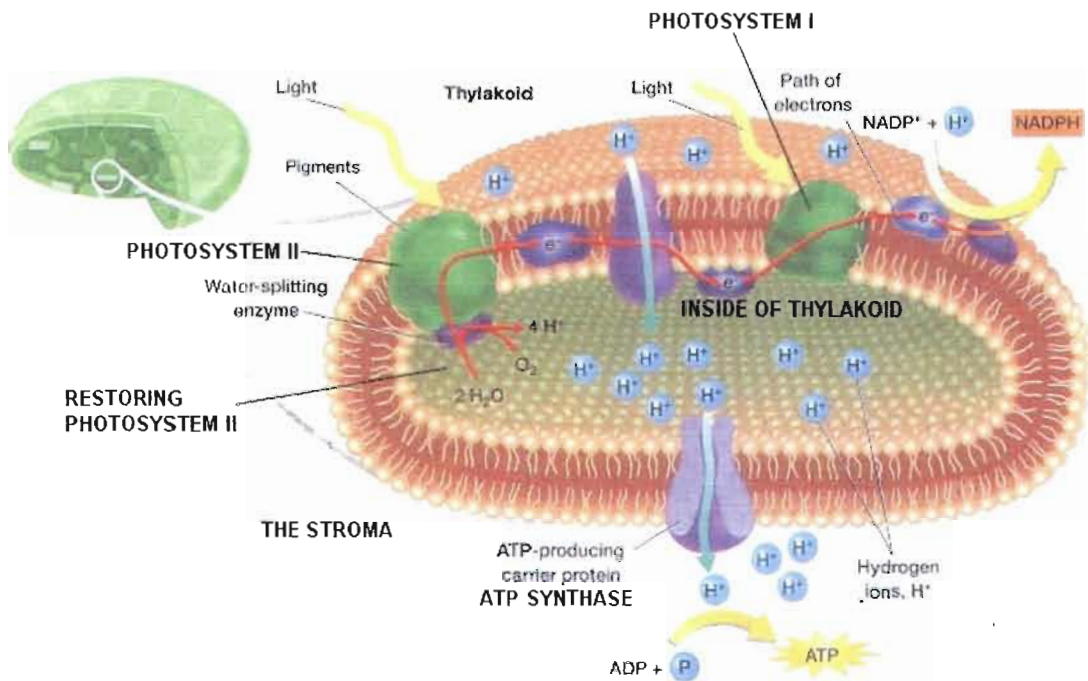


Figure 1.2 Modèle de la structure d'un thylacoïde: les unités protéiques (D'après Lehninger et *al.*, 1994).

Les différents complexes protéiques de la membrane du thylacoïde sont organisés afin de permettre un fonctionnement efficace de l'appareil photosynthétique. En effet, les complexes pigments-protéines du PSII se situent principalement dans les régions granaires tandis que ceux du PSI, le complexe cytochrome b_6f et de l'ATP synthétase se retrouvent majoritairement dans les régions non empilées ou inter-granaires (Anderson et Anderson, 1982).

1.2.2 L'absorption de la lumière

La première étape de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique est l'absorption de la lumière. Les organismes photoautotrophes ont recours à différents pigments : la chlorophylle *a* (Chl*a*), la chlorophylle *b* (Chl*b*), les caroténoïdes, les phycocyanines et les phycoérythrine. Ces pigments sont associés aux protéines formant les LHCI et LHCII. Selon leur configuration moléculaire (Figure 1.3), chaque pigment absorbe spécifiquement à certaines longueurs d'ondes et l'ensemble des spectres d'absorption de ces pigments couvre la quasi-totalité du spectre électromagnétique du domaine visible (Figure 1.4). Ainsi, l'appareil photosynthétique exploite l'énergie lumineuse pour obtenir un rendement optimal (Joliot et Joliot, 1978). De plus, d'autres pigments, dont les caroténoïdes et les xanthophylles, jouent un rôle de protection contre les effets de la photo-oxydation lors d'une exposition intense et prolongée à la lumière (Baroli et *al*, 2004).

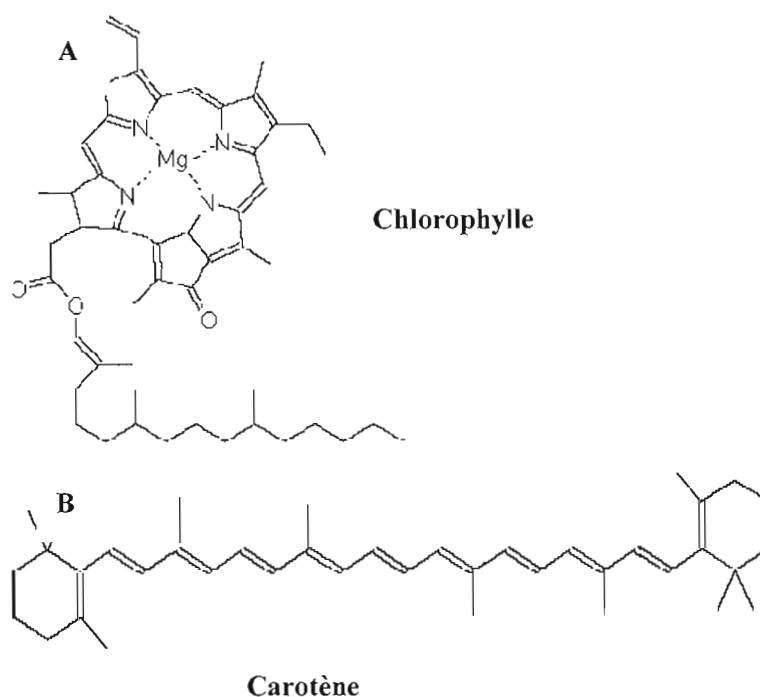


Figure 1.3 Structure moléculaire des molécules de (A) chlorophylle et de (B) carotène.

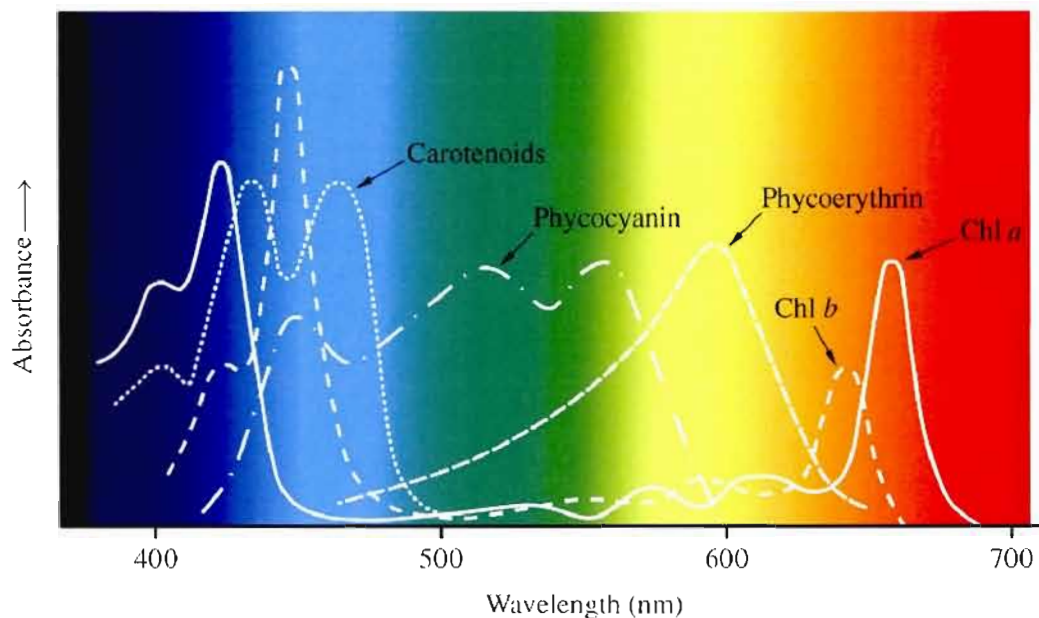


Figure 1.4 Spectre d'absorption des différents pigments photosynthétiques (Tiré de Rawn, 1990).

Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement (10^{-15} s) de l'état stable à l'état excité (exciton). Il existe plusieurs états d'excitation : l'état singulet qui est de courte durée de vie et dont les rotations d'électrons sont antiparallèles puis l'état triplet avec une plus longue durée de vie et dont le sens des électrons est parallèle. Par la suite, plusieurs options s'offrent à la molécule excitée afin de retrouver son niveau d'énergie basal. L'énergie peut être réémise sous plusieurs formes :

1. L'émission d'énergie sous forme de chaleur (10^{-11} s)
2. L'émission d'énergie sous forme de fluorescence (10^{-9} s)
3. Le transfert d'énergie à une molécule adjacente
4. La réaction photochimique primaire impliquant la perte d'un électron et une séparation de charges (10^{-12} s) (Bucchanan et *al.*, 2001).

Il existe une certaine compétition entre ces voies de dissipation de l'énergie où le processus dominant sera le plus rapide (Figure 1.5). Donc, s'il y a un accepteur d'électrons disponible pour la photochimie, ce qui dépend des états d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons, ce mode de dissipation de l'énergie sera favorisé. Il est à noter que seules les molécules de chlorophylle se trouvant à l'état singulet participent aux réactions photochimiques puisque les molécules à l'état triplet prennent plus de temps pour revenir à l'état d'énergie initial (Jupin et Lamant, 1999). Les molécules de chlorophylle à l'état triplet ont donc recours aux autres méthodes de dissipation énergétique.

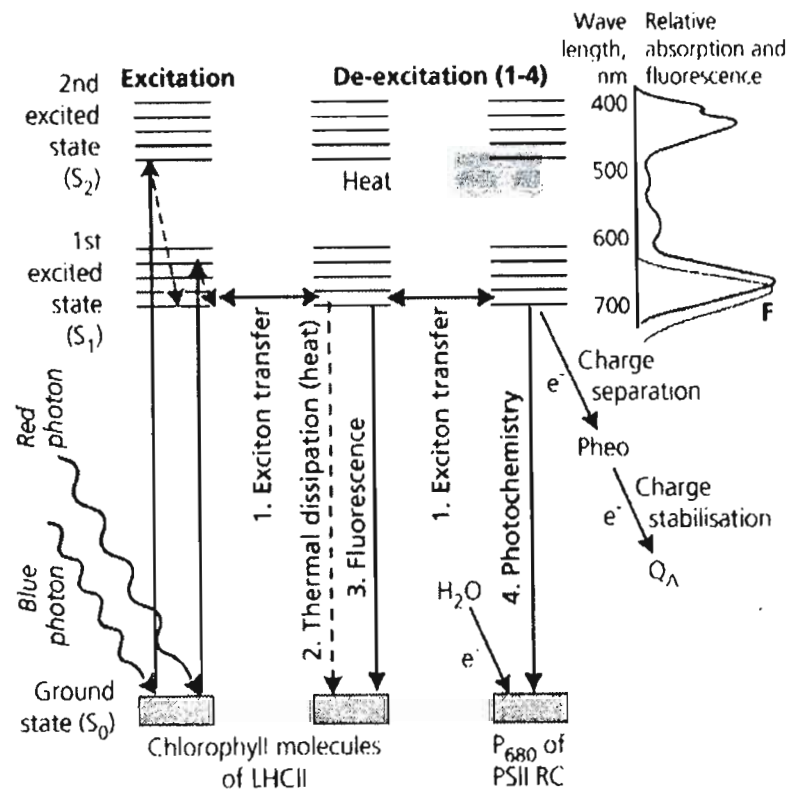


Figure 1.5 Les niveaux d'énergie d'une molécule de chlorophylle et ses mécanismes de dissipation (Tiré de Harbinson et Rosenqvist, 2003).

Avant qu'il y ait séparation de charges au niveau du centre réactionnel, l'énergie photonique captée est transférée d'un pigment à l'autre jusqu'au centre réactionnel du PSII, le P680, où il y a séparation de charges et initiation des processus physico-chimiques (Figure 1.6). C'est donc cette séparation de charges qui mène à un transport d'électrons et qui est à la base de tout le fonctionnement de la photosynthèse.

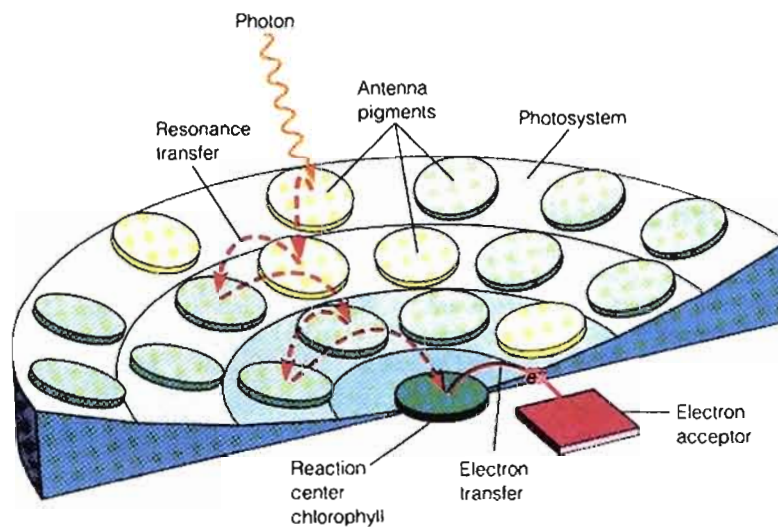
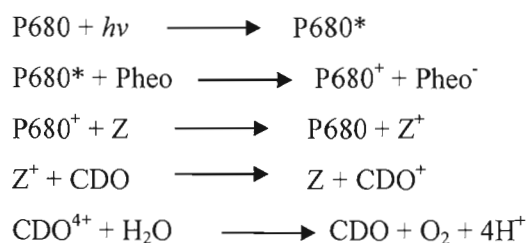


Figure 1.6 Transfert de l'énergie entre les molécules de l'antenne collectrice de lumière (Tiré de Campbell, 1995).

1.2.3 Séparation de charges et dégagement de l'oxygène

Une fois le niveau d'énergie d'excitation suffisant, le P680 constitué d'une paire spéciale de Chl *a*, devient à l'état excité, P680*, et il y aura un transfert d'électron à une molécule voisine, la phéophytine *a*, c'est-à-dire une séparation de charges $\text{P680}^+\text{Pheo}^-$. Il s'agit de l'étape initiale du transport d'électrons. La perte de l'électron du P680 sera comblée par l'apport d'un électron provenant d'un résidu de tyrosine (Z) en position 161 sur la sous-unité D1. La photolyse de l'eau par le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) réduira le résidu tyrosine pour rétablir la charge électronique.

Il est donc possible de résumer la séparation de charges et le dégagement d'oxygène par les cinq réactions suivantes :



La cinquième étape étant le résultat de quatre fois les étapes 1 à 4, la formation d'une molécule d'oxygène exige au maximum quatre étapes photochimiques élémentaires (Hall et Rao, 1994). C'est à la fin des années 60, qu'il a été montré par Joliot que l'oxygène était émis de façon irrégulière, soit d'une périodicité d'ordre quatre, lorsque des chloroplastes étaient excités par des éclairs lumineux (Figure 1.7).

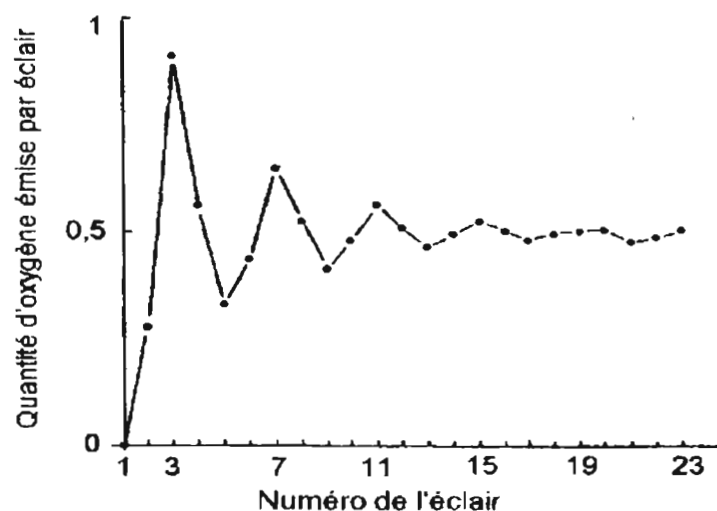


Figure 1.7 Périodicité du cycle de production d'oxygène (Tiré de Joliot et *al.*, 1969).

Le modèle des états d'oxydation du «cluster» de manganèse (Mn) incorporé au complexe de dégagement d'oxygène conçu par Koe et son équipe explique ce phénomène (Figure 1.8). Les deux premières étapes de ce cycle, $S_1 - S_2$, fournissent un électron au centre réactionnel excité via la tyrosine 161 de la protéine D1 et il y a relargage d'un proton dans le lumen, ce qui contribue à la formation d'un gradient de proton à travers la membrane du thylacoïde. Tandis que les étapes $S_3 - S_4$ fournissent seulement l'électron pour la réduction de la

tyrosine tout en créant le pouvoir oxydant qui sera utilisé pour transformer l'eau en oxygène lors du passage de l'état S_4 - S_0 . De plus, il a été montré que les étapes S_3 - S_4 - S_0 étaient les étapes limitantes de ce cycle (Babcock et *al.*, 1987).

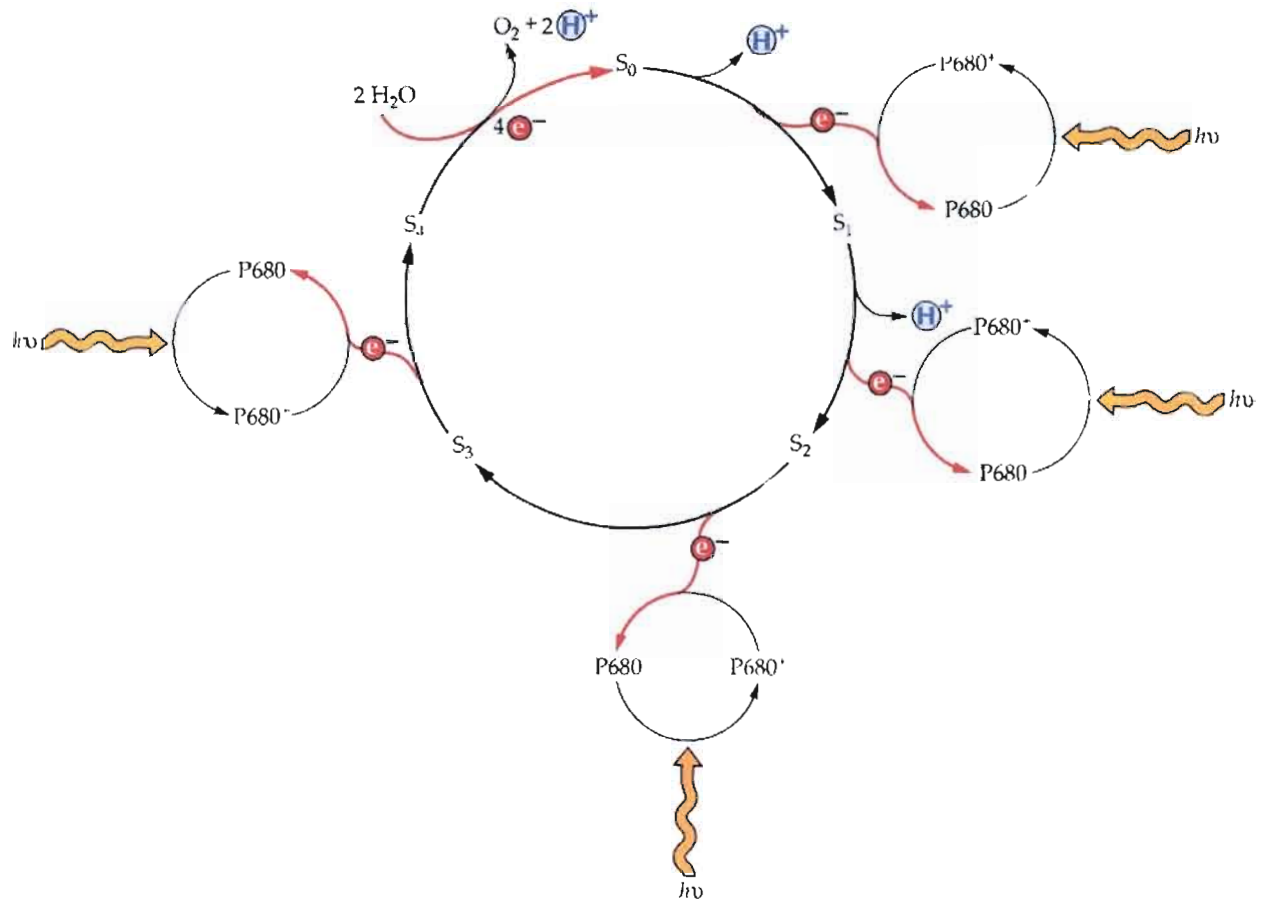


Figure 1.8 Schéma de la formation des états d'oxydoréduction (S_N) et la production de protons pendant l'oxydation de l'eau conduisant au dégagement d' O_2 (Tiré de Buchanan et *al.*, 2001).

Il est désormais possible de faire la distinction entre le côté accepteur et le côté donneur d'électrons du P680. En effet, la phéophytine se trouve du côté accepteur tandis que le CDO et la tyrosine en position 161 de la sous-unité D1 sont du côté donneur. La figure 1.9 représente l'ensemble des notions de cette section.

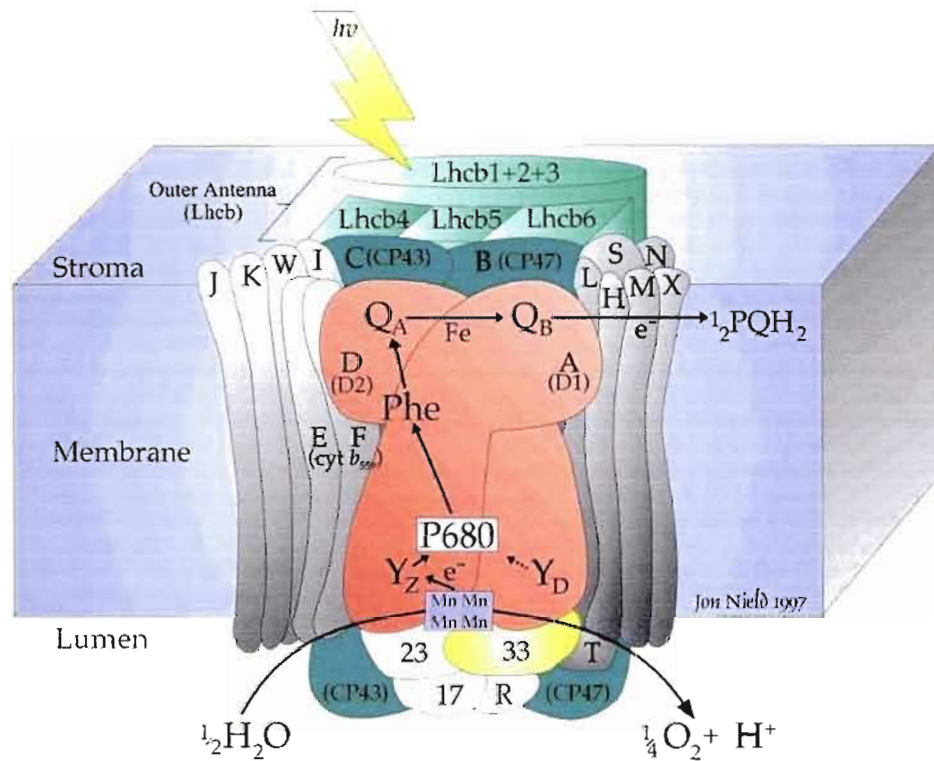


Figure 1.9 Modèle structurel détaillé du centre réactionnel du PSII. (D1 et D2 : protéines dominantes du PSII; Mn : groupement ou «cluster» de manganèse; CP43 et CP47 : protéines liant la chlorophylle; Lhcb 1,2,3,4,5 et 6 : protéines constituant l'antenne collectrice; cyt b559 : cytochrome b559; PQH₂ : plastoquinone réduite; Q_A = quinone a; Q_B = quinone b; E et F sont des protéines formant le cytochrome b559; J,K,W,I,L,S,N,H,M et X sont des sous-unités structurales du PSII) (Tiré de Rawn, 1990).

1.2.4 Le transport d'électrons

Suite à la séparation de charges, l'électron préalablement accepté par la phéophytine est transféré à la quinone A (Q_A) qui est fixée à son site de liaison sur la sous-unité D2 du PSII. Une fois la Q_A réduite sous la forme semiquinone, l'électron est transféré à la quinone B (Q_B) qui possède un site de liaison à la sous-unité D1 du PSII (Figure 1.10). Cette étape réoxyde Q_A et est catalysée par la présence d'un ion Fe^{2+} entre les deux quinones. Par la suite, un deuxième électron, provenant d'une deuxième séparation de charges du P680, fera le même trajet pour ainsi former l'intermédiaire Q_B^{2-} qui est alors complètement réduite, donc sous la forme semiquinol. La Q_B a la propriété d'être plus stable; elle peut donc accepter deux électrons avant sa protonation par deux protons (H^+) provenant du stroma formant ainsi le plastoquinol réduit (PQH_2). Le plastoquinol peut diffuser dans la membrane du thylacoïde, laissant la place libre sur la protéine D1 pour une nouvelle Q_B . Ainsi, les plastoquinols réduits s'accumulent dans la membrane et forment le «pool» de plastoquinols.

Le transport d'électrons se poursuit vers le PSI via un complexe de protéines membranaires, le complexe cytochrome b_6f (Figure 1.11). Ce dernier fonctionne comme une plastoquinol-plastocyanine oxydoréductase, c'est-à-dire qu'il fixe PQH_2 et transfère les électrons à la plastocyanine fixée à son site situé du côté du lumen. Les protons libérés se retrouvent au niveau du lumen et contribuent à la formation du gradient de protons tandis que la Q_B retourne au «pool» de plastoquinones.

La plastocyanine est une petite protéine à cuivre de 11 kDa dont le rôle est de réduire le centre réactionnel du PSI, le P700, suite à sa séparation de charges. En effet, suite à l'absorption de l'énergie photonique par les antennes collectrices de lumière, la séparation de charges s'effectuent entre $P700^*$ et une molécule dénotée A_0 que l'on croit être un monomère de chlorophylle a (Gregory, 1989). Ensuite, l'électron passe de A_0^- à la phylloquinone (A_1) puis à une série de trois protéines Fe-S dénotées F_x , F_A et F_B respectivement avant d'aboutir à la ferredoxine (Fd) qui est le substrat de la $NADP^+$ -ferredoxine oxydoréductase. Le produit de cette catalyse enzymatique se déroulant au niveau du stroma est le NADPH selon la stœchiométrie suivante :



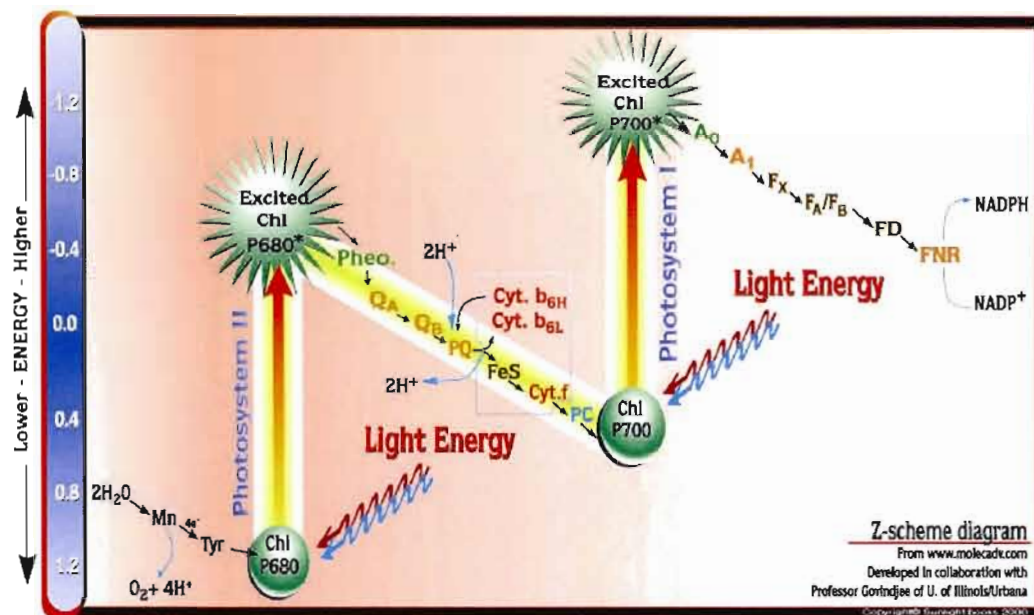


Figure 1.10 Niveaux d'énergie du transport linéaire des électrons entre les photosystèmes I et II. (Tyr : Tyr 161; PC : plastocyanine; PQ : plastoquinone; FeS : protéine fer-soufre; Cyt : cytochrome; A₀ : accepteur initial du photosystème I; A₁ : phylloquinone; Fx : protéine fer-soufre, F_A et F_B : centres fer-soufre; Fd = ferrédoxine (Tiré de Govindjee et Govindjee, 1974).

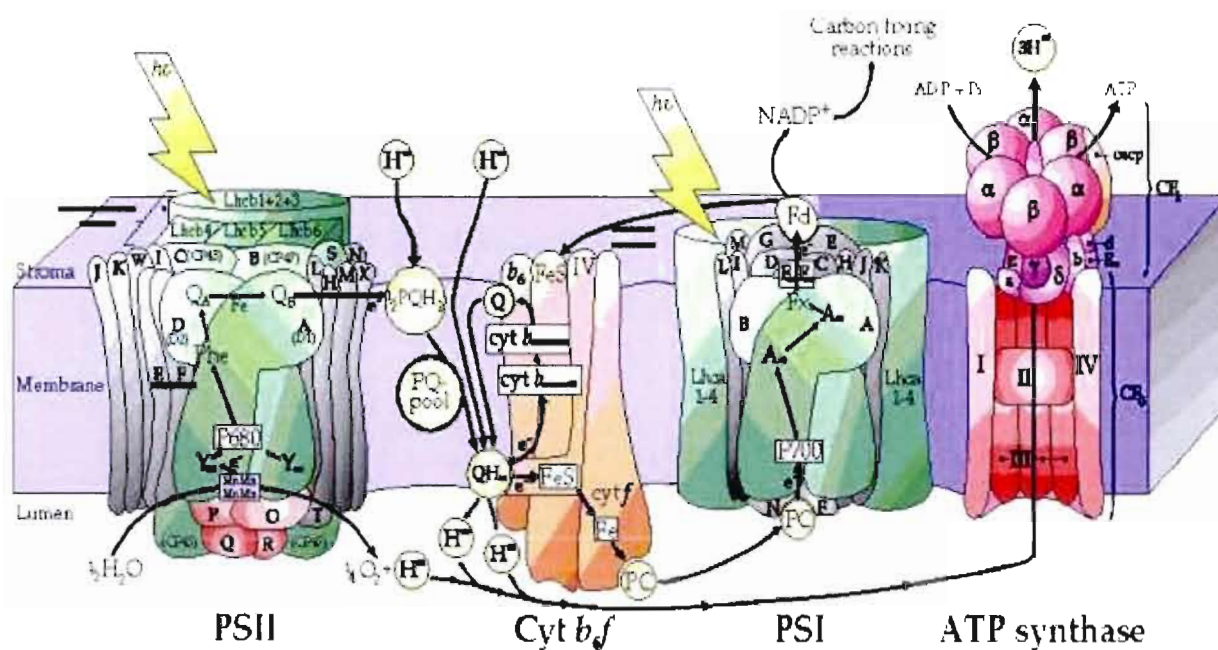


Figure 1.11 Reconstitution schématique du transport non cyclique des électrons (I, II, III et IV : sous unités structurales de la pompe à protons; α , β , δ , ϵ , γ : sous unités protéiques de la pompe à protons) (Tiré de Rawn, 1990).

Le cofacteur NADPH est utilisé pour son pouvoir réducteur au cours du cycle de Calvin qui a pour rôle la fixation du CO_2 et la synthèse d'hydrates de carbones (Benson et Calvin, 1950). De plus, lors du transport linéaire d'électrons et de la photolyse de l'eau se produit un gradient de protons à travers la membrane du thylacoïde. C'est l'ATP synthétase, qui utilise un gradient chimio-osmotique pour la formation de l'ATP à partir d'ADP et de P_i . Donc, le NADPH, l'ATP et le CO_2 fixé sont les moteurs de la formation de l'énergie chimique en apportant respectivement le pouvoir réducteur, l'énergie et la source de carbone nécessaire.

Dans certaines conditions, par exemple lorsqu'il manque de NADP^+ , c'est-à-dire lorsque le transport d'électrons n'a plus d'accepteur final, les électrons peuvent être transférés à d'autres molécules dont l'oxygène. Ceci a pour conséquence la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent être nocives pour la cellule. Afin de pallier à la formation de ces intermédiaires toxiques, l'appareil photosynthétique met en place un transport cyclique d'électrons qui n'implique pas le PSII. La Fd_{red} transfère l'électron à la Fdx-PQ-oxydoréductase qui joue le rôle du PSII en réduisant les plastoquinones (Figure 1.12). Ceci a pour effet d'augmenter le gradient de protons à l'intérieur du lumen. Il va s'en dire que plusieurs autres mécanismes de régulation se mettent en branle afin d'éviter la formation d'ERO, notamment le cycle des xanthophylles.

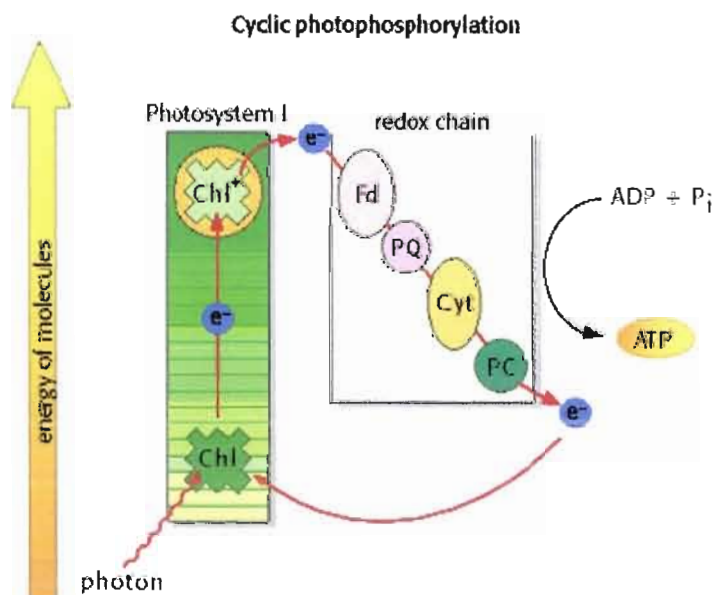
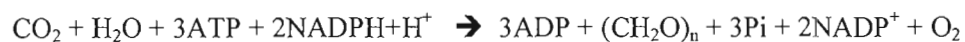


Figure 1.12 Transport cyclique des électrons (D'après Govindjee et Govindjee, 1974).

1.2.5 Les réactions de la phase obscure

Lors des réactions biochimiques menant à la synthèse des glucides au niveau du stroma, il y a consommation de neuf molécules d'ATP et de 6 molécules de NADPH produites lors du transport d'électrons. En effet, il y a d'abord fixation de CO₂ puis trois molécules de ce gaz sont utilisées pour la carboxylation de trois molécules de ribulose biphosphate (RuBP) formant ainsi six molécules de 3-phosphoglycérate via l'enzyme ribulose biphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco). Ces molécules sont ensuite phosphorylées donnant lieu à six molécules de 1,3-bisphosphoglycérate utilisant six molécules d'ATP. Puis, six molécules de NADPH sont utilisées pour réduire ces molécules de 1,3-bisphosphoglycérate menant à la formation d'autant de molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Cette dernière molécule est à la base de la formation de glucides et autres composés organiques tels les lipides, les acides gras, les acides aminés et les acides carboxyliques. En fait, seulement une des six molécules de G3P sera utilisée pour la synthèse de glucides, les cinq autres serviront à la régénération de RuBP ce qui nécessite trois autres molécules d'ATP (Figure 1.13) (Calvin et Massini, 1952; Calvin et Bassham, 1962).

La réaction globale de l'incorporation d'une molécule de CO₂ est la suivante :



Les espèces végétales dont le résultat de l'intégration du CO₂ est une molécule à trois unités de carbone, tel le 3-phosphoglycérate, sont appelées plantes en C3. Mais il faut savoir qu'il a été observé dans les années 1960 des plantes en C4 dont le premier intermédiaire de la fixation du CO₂ est l'oxaloacétate, un composé à quatre atomes de carbone.

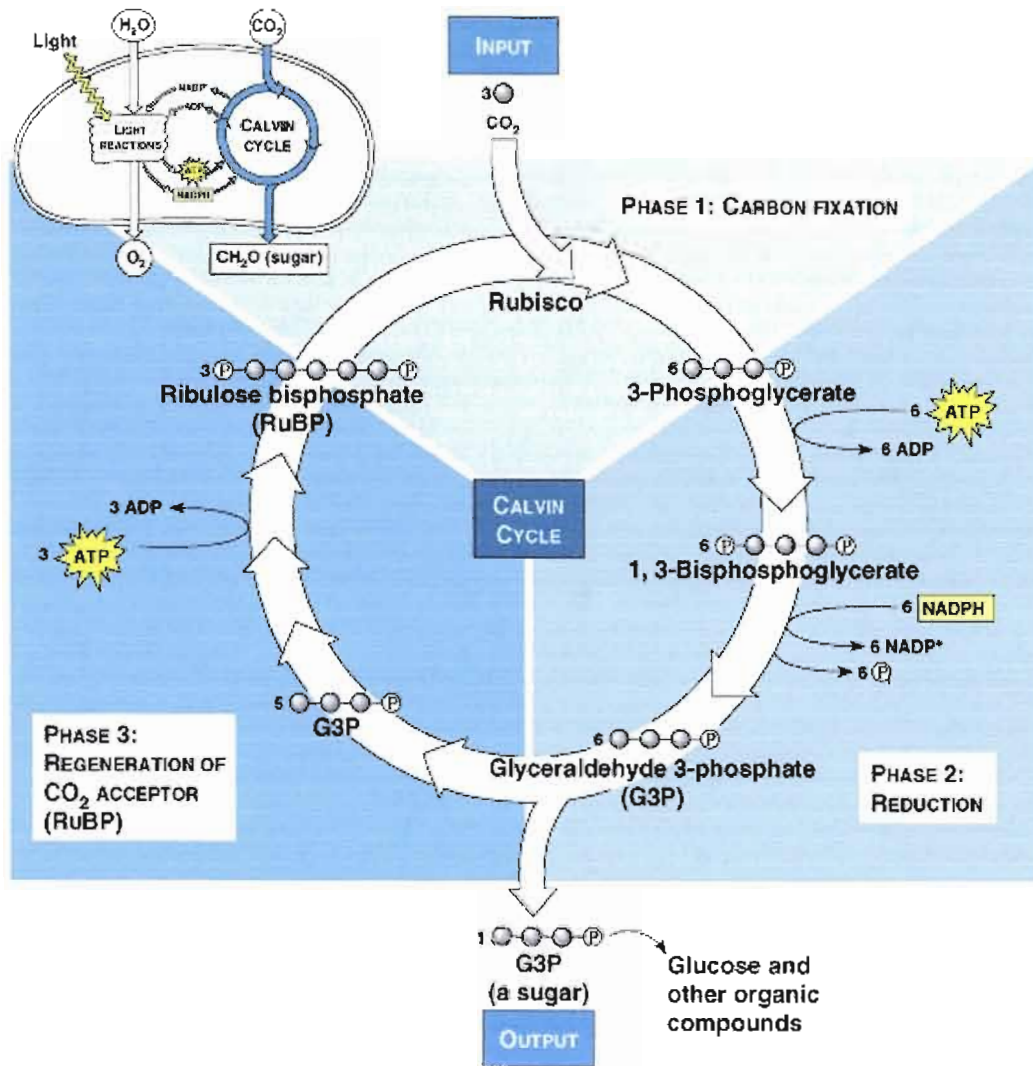


Figure 1.13 La fixation du CO_2 lors du cycle de Calvin (Tiré de Campbell, 1995).

CHAPITRE II

LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE

2.1 Introduction

L'énergie lumineuse absorbée par les antennes collectrices de lumière des photosystèmes peut, lorsqu'elle n'est pas utilisée pour la réaction photochimique primaire, être réémise sous forme de chaleur, de fluorescence ou transmise à une autre molécule afin que la chlorophylle excitée à l'état singulet retrouve son niveau d'énergie de base (Papageorgiou, 1975). L'énergie excédante peut donc être transmise à une molécule d'oxygène (O_2), ce qui crée des ERO qui sont très nocives pour la cellule (Figure 2.1).

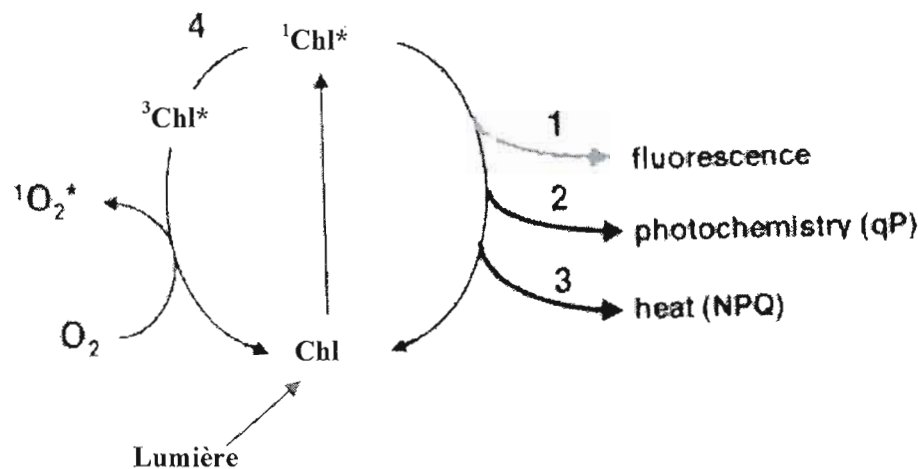


Figure 2.1 Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée (Tiré de Müller et *al.*, 2001).

D'un autre côté, moins de 3% de l'énergie d'excitation absorbée par les pigments est réémise sous forme de fluorescence (Kraus et Weiss, 1991) et environ 90% de la fluorescence totale émane du PSII (Govindjee, 1995). La fluorescence chlorophyllienne est désormais considérée comme un indicateur intrinsèque précis des processus photochimiques et du transport des électrons au niveau du PSII. L'intensité de la fluorescence est donc directement liée au rendement photosynthétique puisque les deux modes de désexcitation

sont compétitifs. Or, cette approche a été utilisée à plusieurs reprises afin d'étudier les effets des polluants et diverses conditions environnementales sur le fonctionnement du transport d'électrons et divers mécanismes de transfert d'énergie au niveau du PSII.

2.2 La cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence chlorophyllienne

La découverte de l'induction de la fluorescence chlorophyllienne est attribuable aux travaux de Kautsky et Hirsh publiés en 1931. Ils ont montré que les algues vertes préalablement exposées à l'obscurité présentaient un niveau de fluorescence qui variait dans le temps lorsqu'elles étaient soumises à une illumination continue. Cet effet fut baptisé «l'effet Kautsky» ou «fluorescence variable». Il est maintenant bien établi que la mesure de la fluorescence chlorophyllienne pratiquée *in vivo* dépend de l'état d'oxydoréduction de l'accepteur primaire d'électron du PSII, la Q_A . En effet, le niveau de fluorescence augmente lorsque Q_A est réduite par le transport d'électrons et diminue lorsque Q_A est réoxydée (Duysens et Sweers, 1963). La figure 2.2 représente différentes phases de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne qui indiquent l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII. Plus récemment, soit au début des années 1990, une nouvelle transition, noté J, a été découverte et observée à un temps de 1 milliseconde lorsque la cinétique rapide fût présentée sur l'échelle logarithmique de temps (Figure 2.3) (Strasser et Govindjee, 1991; Strasser, 1995).

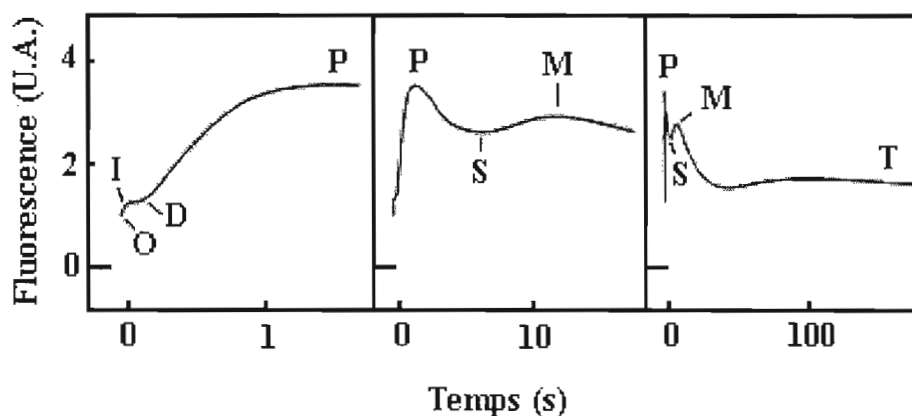


Figure 2.2 Courbes d'induction de fluorescence présentant les différentes transitions (O-I-D-P-S-M-T) sur une échelle croissante de temps (Tiré de Briantais et *al.*, 1986).

La cinétique rapide de fluorescence doit toujours être mesurée après une adaptation à l'obscurité de l'espèce végétale pendant une période de temps nécessaire à l'oxydation complète des transporteurs d'électrons. Par la suite, une lumière saturante produira une cinétique rapide polyphasique de type O-J-I-P lorsque présentée sur une échelle de temps logarithmique.

La fluorescence initiale au point O est une fluorescence dite de base mesurée à 50 μ s, qui est attribuable majoritairement aux antennes collectrices de lumière du PSII riches en Chl *a* (Buttler, 1977) avant que l'excitation n'atteigne le centre réactionnel P680. À ce moment, les transporteurs sont dans l'état oxydé et le centre réactionnel est dit «ouvert» (Munday et Govindjee, 1969; Mathis et Paillontin, 1981). Une fois l'énergie d'excitation suffisante, il y a séparation de charges au niveau du P680, ce qui mène à la réduction des transporteurs d'électrons. Or, l'augmentation du niveau de fluorescence jusqu'à la transition J est attribuable à la réduction des Q_A . La photochimie et la fluorescence étant des méthodes de dissipation de l'énergie compétitives, moins il y a de Q_A disponible pour la réduction via le transport d'électrons (photochimie), plus le niveau de fluorescence s'intensifie. À la transition J, l'ensemble des Q_A devraient être réduites. De plus, la transition J est également influencée par les états de transitions S_x du cycle d'oxydation de l'eau au niveau du complexe de dégagement d'oxygène (Delosme, 1967; Hsu, 1993).

Les phases intermédiaires I et P reflètent les différents états d'oxydation des transporteurs d'électrons associés au PSII. La séquence des états d'oxydoréduction reflète donc l'ordre du transport d'électrons entre les quinones, tel que discuté précédemment (Figure 2.3). De plus, il a été montré que les centres réactionnels ne réduisent pas tous à la même vitesse le «pool» de plastoquinones (Strasser, 1995). Puis, après un certain temps le niveau de fluorescence diminue jusqu'à la transition T dont les causes sont multiples. En effet, le taux d'assimilation du carbone (Walker, 1981), de la libération de l'oxygène (Walker et *al.*, 1983), le gradient de protons à travers la membrane du thylacoïde (Briantais et *al.*, 1979) et l'état d'oxydoréduction des accepteurs primaires d'électrons (Klimov et *al.*, 1981) sont tous des facteurs en cause.

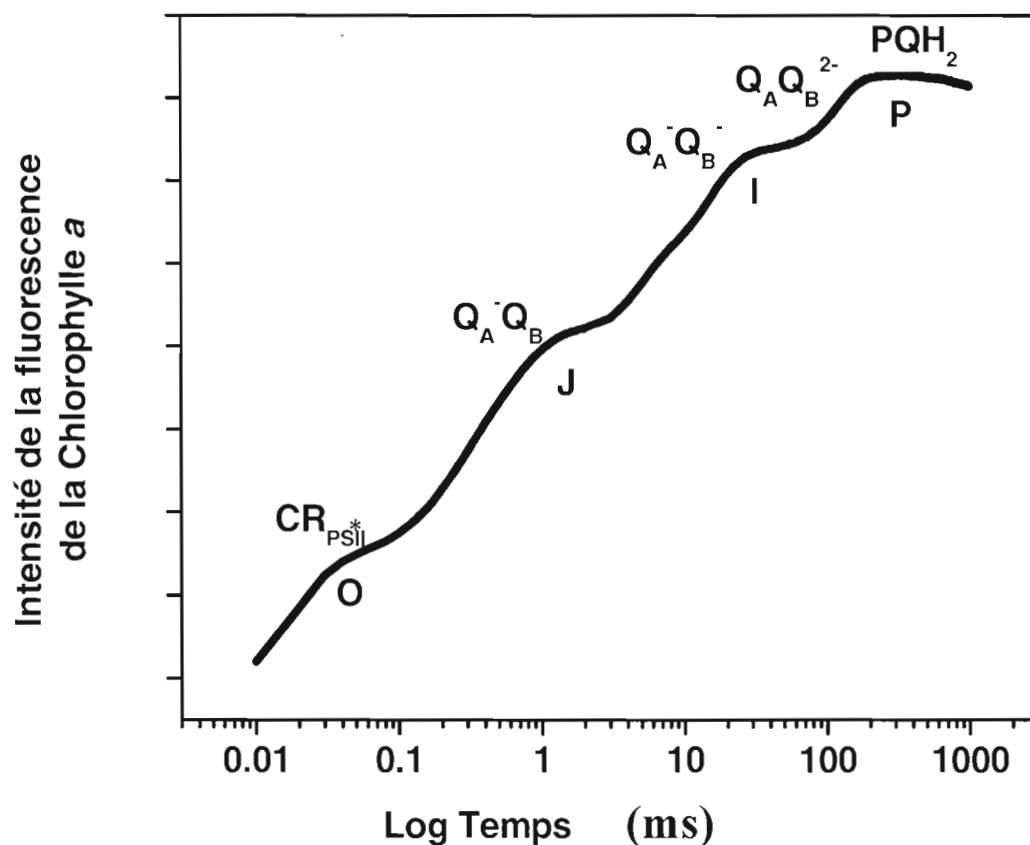


Figure 2.3 Courbe d'induction de fluorescence montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique (Tiré de Strasser et Govindjee, 1991).

2.2.1 Les paramètres de la cinétique rapide

Plusieurs paramètres sont évalués à partir de la cinétique rapide et polyphasique afin de faire le diagnostic de l'effet de polluants ou de diverses conditions environnementales.

2.2.1.1 L'efficacité photochimique maximale du PSII (ϕ PSII ou F_v/F_m)

Il s'agit du paramètre le plus utilisé de la fluorescence chlorophyllienne induite. Une fois l'espèce végétale adaptée à l'obscurité, une illumination saturant les centres réactionnels induit une augmentation de la fluorescence chlorophyllienne d'un niveau basal, F_o , à son niveau maximal, F_p ou F_m . À ce point, nous dirons que les centres réactionnels sont fermés puisque les transporteurs d'électrons sont tous réduits. L'efficacité photochimique est exprimée :

$$(F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m$$

où F_v représente la fluorescence variable.

Ce paramètre estime le rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (Butler et Kitajima, 1975) dont la valeur maximale est évaluée à 0,832 (Bjorkman et Demmings, 1987) chez les plantes supérieures. Une variation de ce paramètre est une bonne indication de l'effet de certains polluants ou conditions environnementales (Karukstis, 1991).

2.2.1.2 Estimation de la taille des antennes collectrices de lumière (ABS/CR)

Ce paramètre informe sur la proportion de centres réactionnels du PSII qui sont inactifs. Ainsi, l'inactivation des CRs par un stress rend la taille apparente des antennes collectrices de lumière plus grande par centre réactionnel. En effet, l'énergie captée par les antennes collectrices de lumière d'un photosystème inactif sera redistribuée vers un centre réactionnel actif (Strasser et Tsimilli-Michael, 1998).

2.2.1.3 Le «quenching» du «pool» de plastoquinones (qPQ)

Comme il en a été question précédemment, la transition entre I et P de la cinétique rapide et polyphasique de fluorescence est dépendante de l'état d'oxydoréduction des quinones

associées au PSII (Strasser, 1999). Or, les valeurs de ce «quenching» pourraient être considérées comme une estimation de la taille du «pool» de plastoquinones participant au transport d'électrons (Strasser, 1999).

2.2.1.4 Le «quenching» lié au gradient de protons (qE_{\max})

Ce «quenching» représente l'effet du gradient de protons sur la diminution de la fluorescence chlorophyllienne entre les transitions P et S. Il est donc possible de déterminer ce paramètre lié au transport de protons entre le stroma et le lumen des thylacoïdes en analysant la cinétique de fluorescence rapide et polyphasique de fluorescence (Strasser, 1999).

2.3 La cinétique de fluorescence modulée

Cette technique de fluorescence chlorophyllienne permet d'étudier les mécanismes de dissipation d'énergie des photosystèmes (Weiss et Berry, 1987; Oquist et Chow, 1992). Pour ce faire, l'appareil appelé PAM (Pulse Amplitude Modulation) utilise quatre sources lumineuses : modulée (MR), saturante (SR), actinique (AR) et rouge lointain (FR) qui permettent l'analyse de la fluorescence chlorophyllienne à différents stades du transport d'électrons associés aux photosystèmes (Figure 2.4) (Shreiber et *al.*, 1986).

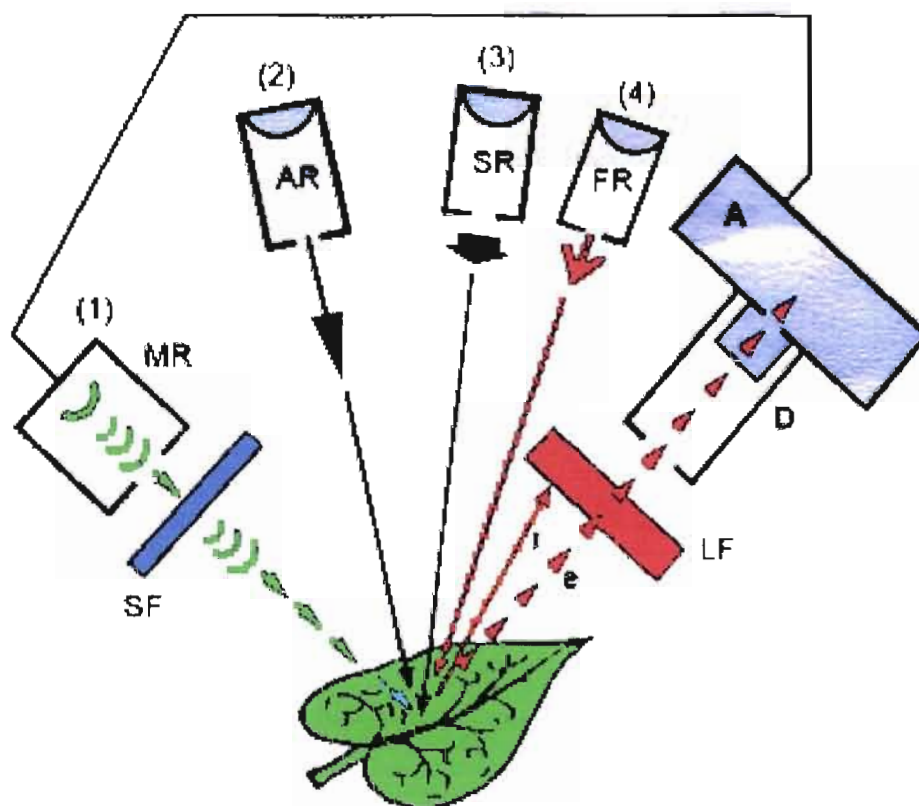


Figure 2.4 Schéma du fonctionnement d'un fluorimètre modulé (PAM). A = Fluorimètre; D = détecteur (modulé); MR = lumière modulée; AR = lumière actinique; SR = Lumière Saturante; FR = lumière rouge lointain; SF et LF = Filtres optiques.

D'abord, il faut que les transporteurs d'électrons soient à l'état oxydé en adaptant l'échantillon à l'obscurité (DAS). Puis, la lumière analytique modulée est allumée. Cette lumière est d'une intensité inférieure à $0.1 \mu\text{mol de photons m}^2 \text{ s}^{-1}$, ce qui est trop faible pour induire une séparation de charges au niveau du P680. Elle sert donc à la détermination du niveau de fluorescence basal, F_0 . Un avantage de l'utilisation de cette lumière modulée est de permettre au système de détection d'enregistrer seulement la fluorescence émanant de la chlorophylle en tenant compte de la fréquence et de la phase de la lumière modulée afin d'éviter les interférences (bruit de fond). Une fois F_0 déterminé, la lumière saturante réduit tous les transporteurs d'électrons en utilisant une lumière polychromatique de plus de $1000 \mu\text{mol de photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ pour une durée variant entre 300 et 700 ms selon l'espèce végétale.

utilisée. Ceci sert à fermer les centres réactionnels et à donner le niveau de fluorescence maximale, F_m , ce qui permettra éventuellement de déterminer les rendements photochimiques. Une fois le flash terminé, le niveau de fluorescence revient à son niveau de base. À ce moment, la lumière actinique, 100 à 150 μmol de photons $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, d'une intensité équivalente à la lumière ambiante est allumée. À partir de ce moment, l'échantillon est adapté à la lumière (LAS) et ceci est caractérisé par une synthèse d'ATP et de NADPH de façon continue et accompagnée par la fixation de CO_2 (Walker, 1987). Puis, à intervalles constants, des flashes saturants, de même intensité que celui administré lorsque l'espèce végétale était adaptée à l'obscurité, sont appliqués et donnent la valeur de fluorescence maximale lorsque l'échantillon est adapté à la lumière (F'_m). Ceci se fait jusqu'à ce qu'un équilibre se forme (F_s). Les changements dans cette cinétique de fluorescence chlorophyllienne sont attribuables au mélange des processus photochimiques et non-photochimiques tels le gradient de pH à travers la membrane du thylacoïde, de la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, de la photophosphorylation des antennes collectrices de lumière ainsi que de la photoinhibition du P680 (Krauss et Weis, 1991; Govindjee, 1985; Maxwell et Johnson, 2000). Une fois que cet équilibre est atteint, la lumière actinique est éteinte et une lumière du rouge lointain (FR) est allumée. Cette dernière excite plus le P700 que le P680, ce qui a pour effet de drainer les électrons vers le PSI et par le fait même de réoxyder les transporteurs d'électrons associés au PSII, ce qui donne une fluorescence de base F'_o (Figure 2.5).

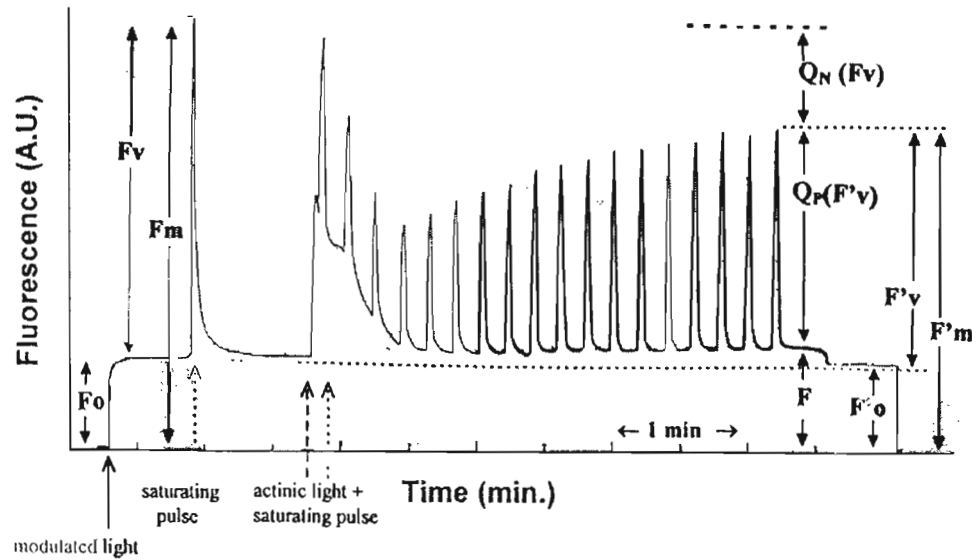


Figure 2.5 Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM. F_o : fluorescence constante pour une plante adaptée à l'obscurité; $F'o$: fluorescence constante pour une plante adaptée à la lumière; F_v : fluorescence variable; F_m : fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité; $F'm$: fluorescence maximale pour une plante adaptée à la lumière; q_N : «quenching» non photochimique; q_P : «quenching» photochimique (Tiré de Rohacek, 2002).

2.3.1 Les paramètres associés à la cinétique de fluorescence chlorophyllienne modulée

2.3.1.1 L'efficacité photochimique maximale du PSII (ϕ_M)

Un flash lumineux saturant provoque le passage du niveau basal de fluorescence, F_o , au niveau maximal (F_m) pour un échantillon adapté à l'obscurité dont les transporteurs d'électrons sont tous oxydés. En utilisant les valeurs de F_o et F_m , il est possible de calculer l'efficacité photochimique maximale du PSII comme suit (Genty et *al.*, 1989):

$$\phi_M = (F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m.$$

Ce paramètre représente le rendement quantique de la photochimie primaire au centre réactionnel du PSII (Butler et Kitajima, 1975). La différence entre ϕ_M et ϕ_{PSII} obtenu au PEA provient de la méthode qui détermine le F_o . En effet, le PEA utilise la fluorescence

émise après 50 μ s d'illumination tandis que le PAM utilise une faible intensité lumineuse afin de calculer la valeur de F_o .

2.3.1.2 L'efficacité photochimique opérationnelle du PSII (ϕ'_M)

Il s'agit en fait de l'efficacité photochimique maximale du PSII lorsque l'échantillon est adapté à la lumière. Ce paramètre se calcule comme suit (Genty et *al.*, 1989):

$$\phi'_M = (F'_m - F'_o) / F'_m = F'_v / F'_m$$

Donc, ce paramètre est proportionnel au transfert de l'énergie entre le P680 et Q_A à l'état stationnaire (F_s), ce qui tient compte seulement des centres réactionnels ouverts qui participent au transport d'électrons pour un échantillon adapté à la lumière. En effet, lorsque l'échantillon est adapté à la lumière, une certaine partie des CR ne participent pas au transport d'électrons et sont dits fermés.

2.3.1.3 Le «quenching» photochimique (q_p)

Ce paramètre indique la proportion de photons absorbés par le P680 qui sont utilisés par les CR ouverts sous illumination constante. En effet, dans cette condition, la baisse du niveau de fluorescence dans le temps est due à l'oxydation des transporteurs d'électrons de Q_A vers le «pool» de plastoquinones (Havaux et *al.*, 1991; Kramer et *al.*, 2004) et ainsi q_p représente cette atténuation de la fluorescence qui est attribuable au CR ouverts et est calculée ainsi (Shreiber et *al.*, 1986) :

$$q_p = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_o)$$

2.3.1.4 Le «quenching» non photochimique (q_N)

Ce paramètre est caractéristique de la voie de dissipation d'énergie sous forme non photochimique préalablement captée par les antennes collectrices de lumière (Havaux et *al.*, 1991) et il se calcule (Shreiber et *al.*, 1986) :

$$q_N = 1 - [(F'_m - F'_o) / (F_m - F_o)] = 1 - (F'_v / F_v)$$

Le quenching non photochimique est affecté par différents facteurs et est constitué de trois composantes soit, q_E , q_T , q_I .

Le premier, q_E , est le paramètre dépendant de la formation du gradient de protons à travers la membrane du thylacoïde. Lorsque ce gradient est élevé, il y a des modifications aux ultrastructures des thylacoïdes (Briantais et *al.*, 1986) et formation de la zéaxanthine, qui se lie à la chlorophylle et évite l'excitation de ces molécules empêchant ainsi l'excitation d'atteindre le CR. (Demmig-Adams et *al.*, 1989). Le second facteur, q_T , pour sa part traduit les changements dans les états de transitions des antennes collectrices de lumière. Ces états de transition dépendent de la migration des LHCII associés au PSII vers le PSI. C'est donc un système de régulation de la distribution de l'énergie entre les photosystèmes. Finalement, q_I est la résultante des photodommages subits par les différentes composantes peptidiques du PSII. C'est le «quenching» de photoinhibition qui implique les processus de photoprotection et de réparation des CRs.

CHAPITRE III

LA BIOSYNTHESE DE LA CHLOROPHYLLE

3.1 Introduction

La lumière a une autre utilité importante au sein de la cellule végétale. En effet, dans la majorité de plantes, comme les angiospermes, la lumière est nécessaire à la synthèse des pigments chlorophylliens et constitue le facteur le plus important de la régulation de la biogenèse de l'appareil photosynthétique. La protochlorophyllide (PChlide), le précurseur de la chlorophylle, s'accumule chez les plantes à l'obscurité au niveau des plastides de feuilles, communément appelés étioplastes. Cette accumulation se fait sous forme d'un complexe ternaire photoactif stable constitué de PChlide, de l'enzyme protochlorophyllide oxydoréductase (POR) et du cofacteur NADPH (Oliver et Griffiths, 1982). Suite à une illumination, le complexe est rapidement réduit, formant la chlorophyllide (Chlide) puis, ultérieurement, la chlorophylle. C'est donc cet événement impliquant la lumière qui est suffisant pour déclencher la formation de quelques unités photosynthétiques fonctionnelles (Franck, 1993). Donc, la mise en place de l'appareil photosynthétique chez les espèces végétales peut être étudiée par l'illumination adéquate de l'espèce étiolée.

3.2 L'étioplaste et le développement du chloroplaste

La structure membranaire de l'étioplaste contient le corps prolamellaire (PLB) et les prothylacoïdes (PT). Le PLB est une structure lipidique cristalline qui forme un réseau de membranes au centre de l'étioplaste tandis que les PT sont des membranes plus rudimentaires qui s'étirent vers le stroma (Weier et *al.*, 1970). La protéine POR est la protéine la plus abondante au niveau du PLB (Ikeushi et Murakami, 1983; Ryberg et Dehesh, 1986). De plus, il existe deux types de POR : PORA dont l'activité décline rapidement lors de l'illumination et PORB dont le niveau demeure constant que ce soit au niveau de l'étioplaste ou du chloroplaste suite au verdissement (Holtorf et *al.*, 1995). Une fois la plante étiolée exposée à la lumière, il y aura dispersion des PLB durant laquelle les agrégats de POR se relocalisent au niveau des PT (Ryberg et Dehesh, 1986) et l'étioplaste

devient chloroplaste. Une illumination continue transforme les PT en thylacoïdes dans lesquels les complexes pigments-protéines s'intègrent à la membrane pour former les photosystèmes.

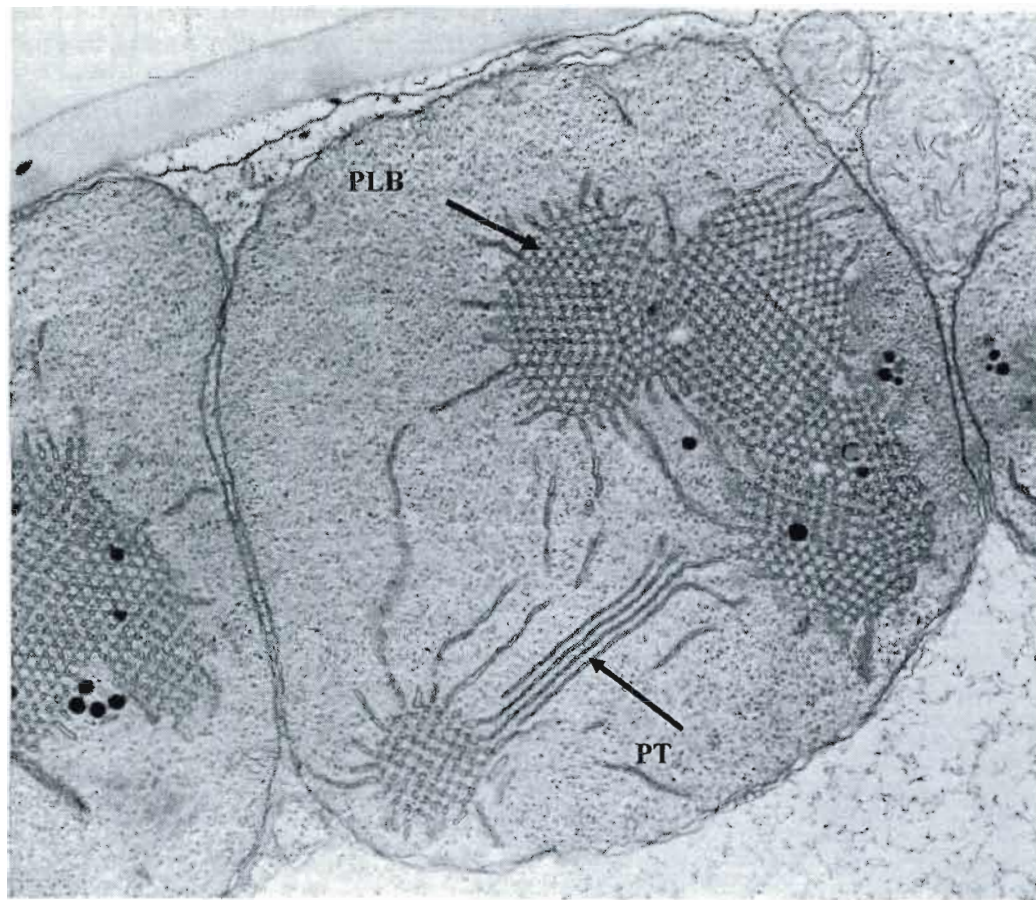


Figure 3.1 Microscopie électronique d'un étioplaste. PT : prothylacoïdes et PLB : corps prolamellaires (Tiré de Hooper, 1984).

3.3 La synthèse de la chlorophylle

3.3.1 La voie des tétrapyrroles

Le processus de la biosynthèse de la chlorophylle se déroule en plusieurs étapes dont le point de départ est l'acide δ -aminolevulinique (δ -ALA) et ses étapes sont toutes localisées au sein du chloroplaste. Pour sa part, l' δ -ALA est produit par l'acide glutamique (Glu) dans une séquence de réactions qui implique un tARN^{Glu} (Bucchanan et *al.*, 2001). Ce genre de réaction est peu commune dans le domaine biochimique puisqu'elle fait intervenir un tARN comme cofacteur. Par la suite, deux molécules d' δ -ALA se condensent pour former le porphobilinogène qui est l'unité de départ de la partie pyrole de la molécule de chlorophylle. En effet, c'est la liaison de quatre molécules de porphobilinogène qui crée le cycle tétrapyrrolique intermédiaire, l'uroporphyrinogène III. Puis, suite à des réactions de décarboxylation et de réarrangements électroniques, il y a formation d'une molécule de protoporphyrine IX qui consiste en un système entièrement conjugué qui est un point d'appui important dans la synthèse des porphyrines. En effet, suite à une chelation avec un atome de fer, la voie de synthèse sera dirigée vers les hèmes tandis que la synthèse des pigments chlorophylliens passe par les six étapes suivantes (Figure 3.2) :

1. Insertion de l'ion Mg divalent au centre de l'anneau porphyrine,
2. Méthylation du groupement propionyle,
3. Formation d'un iso cyclique,
4. Réduction de l'anneau D,
5. Réduction du groupement vinyl-8 via l'activité catalytique de l'enzyme POR,
6. Estérification avec le phytyle.

Comme indiqué, la cinquième étape requiert la présence de POR et, selon les espèces végétales, de la lumière lorsque la régulation de la synthèse de la chlorophylle se fait lors de la réduction de la PChlide par l'enzyme POR, donc chez les angiospermes. D'autres espèces, tels les gymnospermes ou certaines algues, peuvent synthétiser la chlorophylle d'une façon indépendante de la lumière en suivant les mêmes étapes, car leurs enzymes POR ne nécessitent pas la présence de lumière pour être effective, d'où la distinction entre la voie dépendante et indépendante de la lumière pour la biosynthèse de la chlorophylle.

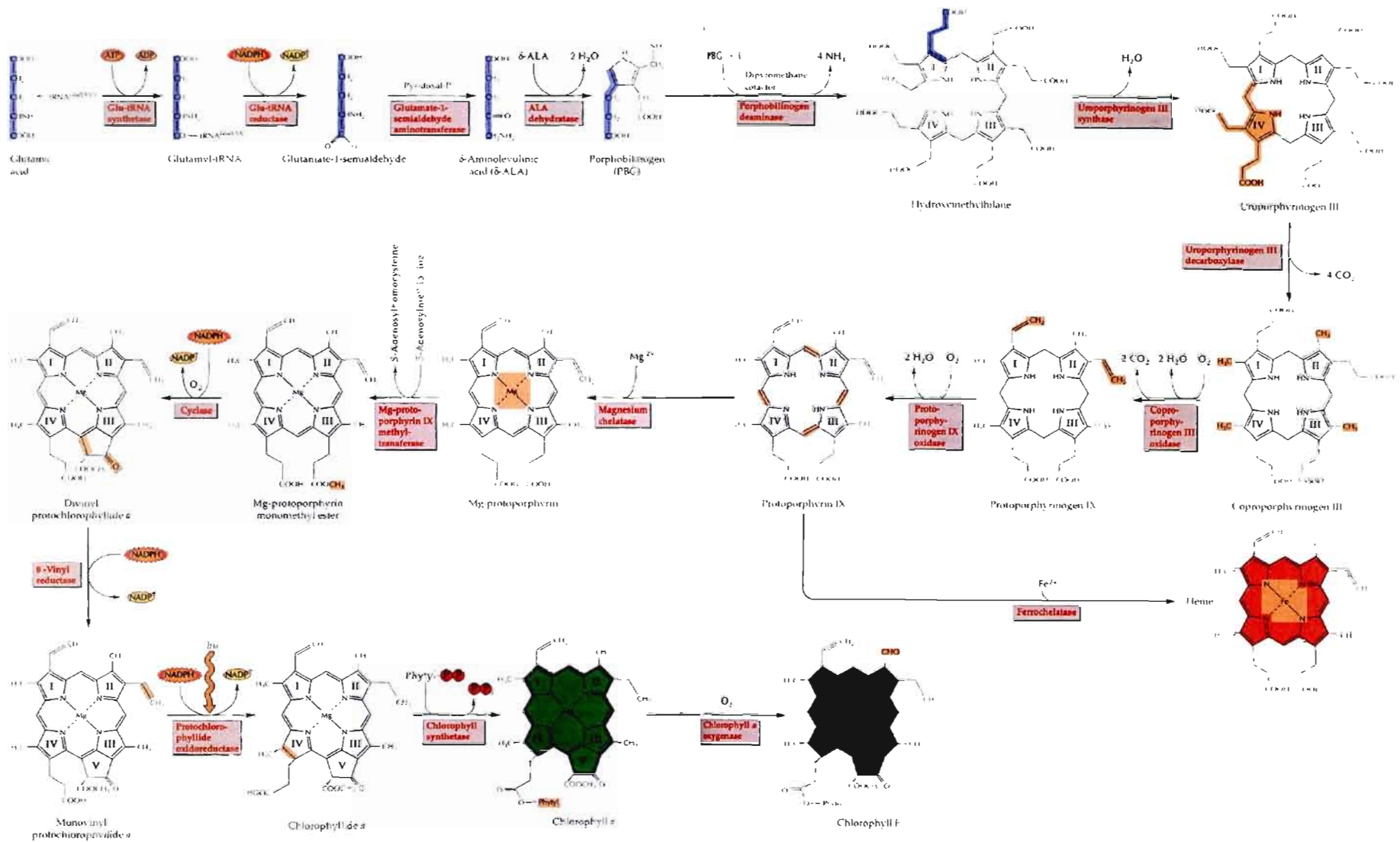


Figure 3.2 Mécanisme de la biosynthèse de la chlorophylle à partir du glutamate (Tiré de Buchanan, 2001).

3.3.2 Les protochlorophyllides

L'orge a été l'espèce végétale la plus utilisée dans la recherche sur les phénomènes du verdissement. Les éléments théoriques concernant la phototransformation de PChlide en Chlide mentionnés s'y rattachent. Il existe plusieurs formes de PChlide qui sont identifiées selon la longueur d'onde à laquelle leur intensité de fluorescence est maximale à basse température (77° K). Ainsi, les formes spectrales les plus connues sont PChlide-F633, PChlide-F645 et PChlide-F654 (Boddi et *al.*, 1992). Les longueurs d'onde de fluorescence maximale peuvent varier d'une espèce à l'autre. Il semble que la forme PChlide-F633 ne peut être photoréduite parce que la molécule de PChlide est libre et non dans sa forme de complexe ternaire (Boddi, 1994). La PChlide-F654 peut être transformée en Chlide par un simple flash lumineux tandis que la PChlide-F645 nécessite la présence d'une lumière continue pour sa phototransformation (Sundqvist et Dahlin, 1997).

3.3.3 L'enzyme POR et son activité

Bien que la POR soit l'enzyme la plus importante des PLB, cette protéine de 22 à 38 kDa (selon les espèces) est synthétisée au niveau du cytosol. Cette enzyme catalyse, en une seule étape, la réduction de la double liaison en position 3 de l'anneau IV de la PChlide pour ainsi former la Chlide (Rudiger et Schoch, 1988; Schoch et *al.*, 1995; Griffiths et *al.*, 1996). Suite à cette phototransformation, il a été observé que la concentration de POR diminue rapidement (Santel et Appel, 1981).

3.3.4 Les changements spectraux

Les modifications subies par les PChlides engendrent des changements observables via les spectres de fluorescence à basse température (77°K) attribuables à la formation de Chlide et de Chl ainsi qu'à la régénération des PChlides photoactives. Pour commencer, PChlide-F655 est réduite en 10 μ s suite à un flash saturant d'au moins 200 ms, ce qui transforme les PChlides actives en Chlide-F689 (Chlide-POR-NADP⁺). Puis, à l'intérieur d'une minute, les Chlide-F689 deviennent Chlide-F694 et ce déplacement dans le spectre est attribuable à la réduction de la molécule de NADP⁺ faisant partie du complexe ternaire (Franck et Mathis,

1980; Innoue *et al.*, 1981). Une quinzaine de minutes plus tard, il est observable sur le spectre de fluorescence à basse température que la bande de Chlide-F694 s'est déplacée vers de plus courte longueur d'onde, soit environ 682 nm. Ce déplacement est mieux connu sous le nom de Shibata shift (Shibata, 1957) et est associé à la disparition du PLB (Henningson, 1970), à la désagrégation des complexes ternaires formant Chlide-F694 et menant à la régénération de PChlide actives (Oliver et Griffiths, 1982) et à la synthèse de Chl(ide) (Henningson et Thorne, 1974). Puis, un déplacement lent de la bande passant de 682 nm à environ 685 nm sur le spectre de fluorescence à 77K témoigne de la formation de Chl par l'estérification via l'activité de l'enzyme Chl-synthase (Franck, 1990) (Figure 3.3). Finalement, après quelques heures, il est possible de visualiser des bandes attribuables aux différents photosystèmes. En effet, la présence des complexes pigments-protéines du PSII est caractérisée par une bande entre 685 et 695 nm tandis que celle du PSI se situe entre 710 et 720 nm.

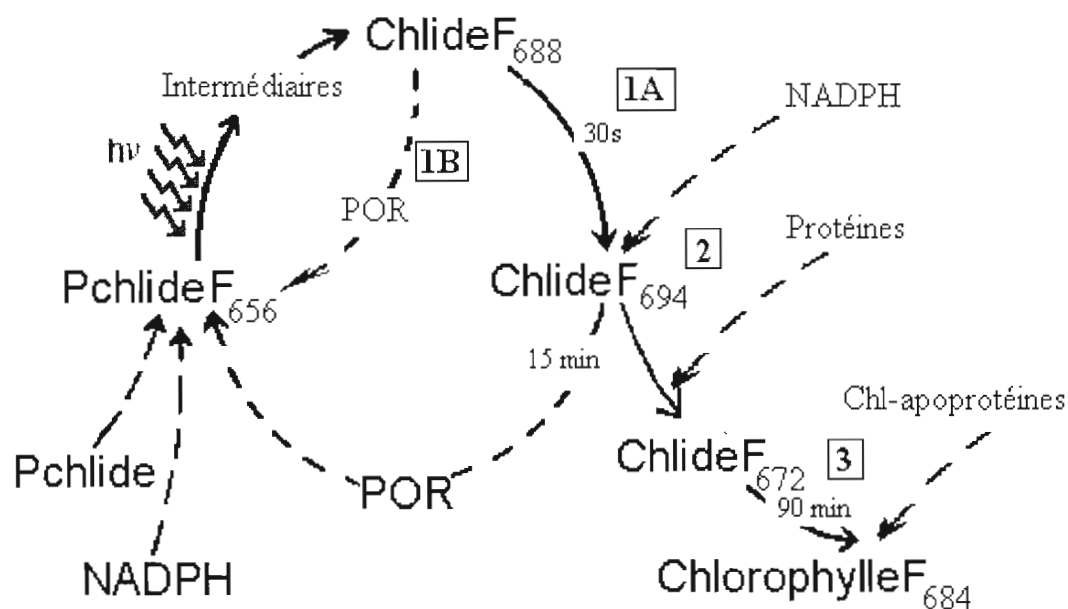


Figure 3.3 Les formes de PChlide, de Chlide, de Chl et leur changements spectraux à 77°K lors des étapes du verdissement.

CHAPITRE IV

LE STRESS OXYDATIF

4.1 La formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'oxygène est un excellent accepteur d'électron et il est biradicalaire. Ceci signifie que cette molécule possède deux électrons de spin parallèle à son état normal. Les radicaux libres se forment lorsque la molécule d'oxygène reçoit ou perd un électron. Les ERO les mieux connus sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et le radical hydroxyl ($\cdot OH$). Ces derniers sont abondamment formés chez les organismes effectuant la respiration aérobie. Bien qu'il ait été montré que les ERO peuvent jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire, il n'en demeure pas moins qu'ils sont nocifs pour l'organisme à fortes doses, pouvant mener à la mort cellulaire. En effet, les ERO s'attaquent aux macromolécules biologiques telles les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Halliwell et Gutteridge, 1999). Il est important de savoir que l'organisme vivant est bien préparé pour se défendre contre les ERO qu'il génère. En effet, l'organisme dispose d'un système de défense pour éliminer le surplus d'ERO. Il y aura un stress oxydatif lorsque les antioxydants ne sont plus en mesure de limiter les effets d'une trop grande concentration d'ERO.

Le changement d'états d'oxydation de l'oxygène se produit selon deux mécanismes :

1. L'absorption d'énergie menant à l'état singulet en changeant le spin d'un électron libre,
2. lors de la réduction monovalente menant à la formation d'une molécule d'eau.

Comme il en a été question précédemment pour la chlorophylle, l'oxygène peut absorber de l'énergie et la molécule excitée aura un spin électronique parallèle, formant l'oxygène triplet. Ce dernier peut accepter un électron pour combler le vide électronique, formant ainsi l'anion superoxyde. Des étapes successives de réductions monovalentes comportent des

intermédiaires très réactifs et mènent à la formation d'une molécule d'eau (McKersie et Leshem, 1994). Voici une description des différents ERO (Figure 4.1) :

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

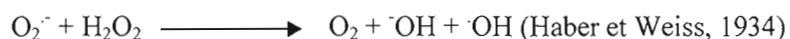
Cet ERO est produite lorsque l'oxygène moléculaire à l'état triplet comble son vide électronique en acceptant un électron. L'anion superoxyde peut alors réagir avec des molécules organiques telles le NADPH ou certaines enzymes, ce qui a pour effet potentiel de les inhiber (Kono et Fridovich, 1982; Lledias et *al.*, 1998). Ce radical libre est également capable de se distribuer par diffusion dans les différents compartiments du système cellulaire.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Cet ERO non radicalaire est un produit de la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme antioxydante dont il sera question plus loin. Cette molécule est moins réactive et peut donc diffuser à travers les membranes lipidiques et réagir loin de son site de production.

Le radical hydroxyl ($\cdot OH$)

Le radical hydroxyl est produit durant la réaction d'Haber-Weiss. Celle-ci implique l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ainsi qu'un cation de transition tel que le Cu^{2+} ou le Fe^{3+} selon la réaction :



ou à partir du peroxyde d'hydrogène impliquant un métal de transition tel que le Fe^{2+} ou le Cr^{5+} selon le mécanisme de Fenton:



Ce radical hydroxyl est le plus toxique et affecte toutes les macromolécules cellulaires. Son site d'action est très localisé en raison de sa grande réactivité (Foyer et *al.*, 1997).

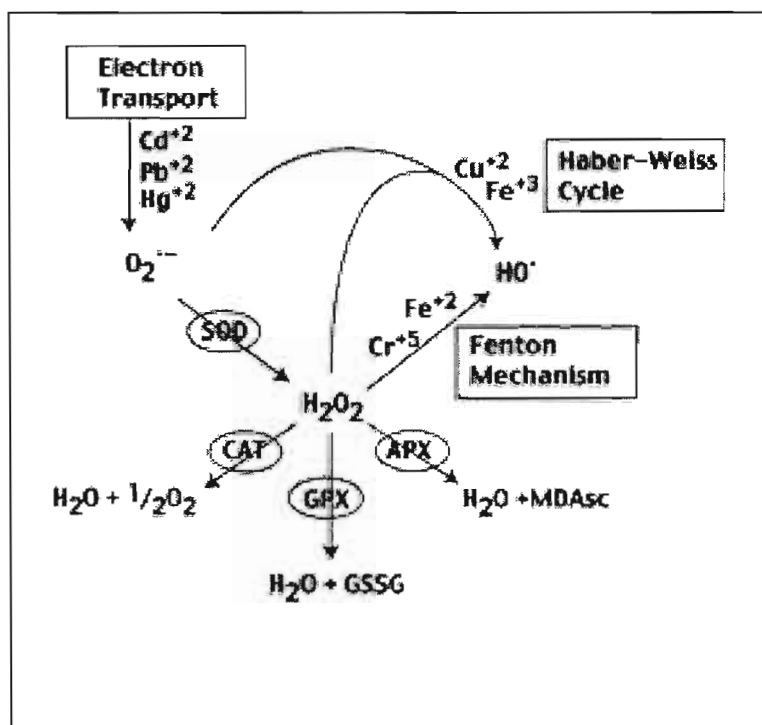


Figure 4.1 Formation et dégradation d'ERO induites par les métaux lourds (Tiré de Pinto et al., 2003).

4.2 Les principaux sites de formation

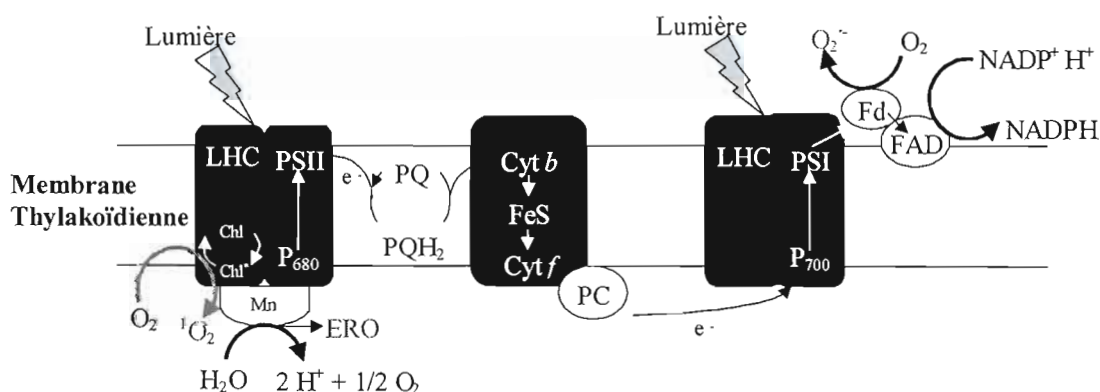
Les organismes photosynthétiques sont plus susceptibles aux dommages causés par les ERO. En effet, en raison du transport d'électrons au niveau des thylacoïdes et de la membrane interne des mitochondries, des concentrations élevées d'oxygène et d'ions métalliques, ces microenvironnements sont plus susceptibles de générer de hautes concentrations d'ERO. Ce potentiel à haut risque de production d'ERO pourrait également être lié au dysfonctionnement des enzymes et photosystèmes jouant un rôle au sein du transport d'électrons. Ces dysfonctionnements peuvent être la conséquence d'un stress lié à la présence de xénobiotiques ou à des facteurs environnementaux.

4.2.1 La photosynthèse et le stress oxydatif

La photosynthèse donne lieu à la formation d'ERO tant lors de la phase lumineuse que lors de la phase obscure. Lors de la phase lumineuse, il y a trois sites principaux de formation d'ERO (Figure 4.2) :

1. Comme il en a été question précédemment, la chlorophylle des photosystèmes à l'état excité peut transférer son énergie à une molécule à proximité, en occurrence l'oxygène, qui passera de l'état triplet ($^3\text{O}_2$) à l'état singulet ($^1\text{O}_2$);
2. Lors du transfert d'électrons du CDO vers le PSII, il peut y avoir transfert d'électron à une molécule d'oxygène préalablement formée;
3. Lorsque le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH} + \text{H}^+$ est faible, l'électron issu du transport d'électrons est transféré de la ferrédoxine à l'oxygène formant ainsi l'anion superoxyde selon la réaction de Mehler. Ceci est le site principal de formation d'ERO au sein du chloroplaste.

Stroma



Lumen

Figure 4.2 Sites de formation d'ERO lors de la photosynthèse (d'après McKersie et Leshem, 1994).

Lors de la phase obscure, le glycolate migre vers le peroxysome et il y est oxydé par en glyoxalate. Cette réaction génère la formation de peroxyde d'hydrogène au niveau du peroxysome.

De plus, il y a formation d'ERO au niveau de la mitochondrie en raison du transport d'électrons qui a lieu au niveau de la membrane interne et de la présence d'oxygène dans ce microenvironnement (Baum et Scandalios, 1979; Fridovich, 1986). Ainsi, le cytochrome P450 génère l'anion superoxyde lors de la décontamination de xénobiotiques, notamment les herbicides, au niveau du réticulum endoplasmique. Finalement, l'activité des oxydases génère la formation d'ERO, en particulier le H_2O_2 . Par exemple, la NADPH-oxydase, qui est une enzyme jouant un rôle important lors de la réponse à un stress biotique ou abiotique, produit l'anion superoxyde lors du transfert d'un électron du NADPH à l' O_2 (Levine, 1999; Segal et Abo, 1993).

4.3 Les antioxydants

Afin de contrer les effets des ERO, les organismes aérobies possèdent un important système de défense et de contrôle qui permet de garder le stress oxydatif à un bas niveau. Ce système de défense utilise à la fois des enzymes et des molécules aux propriétés antioxydantes.

4.3.1 La superoxyde dismutase (SOD)

Comme son nom l'indique, cette enzyme catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde et les produits de la réaction enzymatique sont l' O_2 et H_2O_2 selon la réaction :

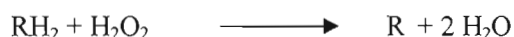


Il y a plusieurs types de SOD qui diffèrent majoritairement selon la composition du cofacteur métallique. Paradoxalement, ce dernier peut être formé d'ions métalliques de cuivre, de zinc, de manganèse ou de fer, lesquels sont également impliqués dans la formation d'ERO (Van Camp *et al.*, 1994; Bowler *et al.*, 1994). Cette enzyme est présente dans presque tous les compartiments cellulaires.

4.3.2 La catalase

Cette enzyme, ubiquitaire aux organismes aérobies, détoxifie la cellule du H_2O_2 formé au niveau du peroxysome. Cette protéine de grande taille, 240 kDa, ne se retrouve pas au niveau du chloroplaste, bien que trois isoformes aient été répertoriés au niveau du cytosol, des peroxysomes et des mitochondries (Chandlee et *al.*, 1983).

La catalase possède deux modes d'action afin de transformer le H_2O_2 en H_2O et O_2 . En effet, à faible concentration de son substrat (μM), la catalase agit telle une peroxydase et utilise le pouvoir réducteur d'une autre molécule (RH_2) comme source de protons selon la réaction suivante :



Où RH_2 peut être l'acide ascorbique, l'acide formique, le formaldéhyde, etc.

À de plus fortes concentrations de H_2O_2 , la catalase utilise deux molécules de son substrat selon la réaction suivante :



Il semble que le «turn-over» de la catalase soit très rapide et même comparable à celui de la sous unité D1 du PSII (Hertwig et *al.*, 1992). De plus, ce «turn-over» est affecté à la baisse en présence de facteur environnementaux tels la salinité et la température (Leipner et *al.*, 2000).

4.3.3 L'acide ascorbique et l'ascorbate peroxydase

L'acide ascorbique, communément appelé vitamine C, joue plusieurs rôles au sein de la cellule. Il se retrouve tant au niveau du chloroplaste, du cytoplasme, de la mitochondrie et de la vacuole (Horemans et *al.*, 2000). C'est un antioxydant puissant qui réagit rapidement avec le radical superoxyde, l'oxygène singulet, l'ozone et le peroxyde d'hydrogène. L'acide ascorbique peut également accepter l'électron final du transport d'électrons du thylacoïde et ainsi éviter la formation d'ERO advenant le transfert de cet électron à une molécule d'oxygène. De plus, l'acide ascorbique est impliqué dans la synthèse d'un autre antioxydant puissant, l' α -tocophérol (ou vitamine E).

Au niveau du chloroplaste, l'ascorbate peroxydase est la principale enzyme responsable de la détoxification du H_2O_2 . Elle catalyse la réaction suivante :



Les molécules d'acide ascorbique sont régénérées selon deux mécanismes :

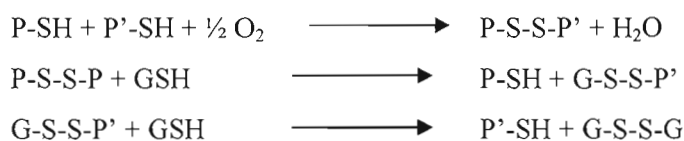
1. à partir du pouvoir réducteur du NADPH sous l'activité de l'enzyme monodéhydroascorbate réductase
2. suite à la formation de déhydroascorbate, la déhydroascorbate réductase utilise le pouvoir réducteur du glutathion tel qu'illustré par le cycle Halliwell-Asada (Figure 4.3). Dans les conditions normales, l'acide ascorbique se trouve à 90 % sous sa forme réduite (Foyer, 1993).

4.3.4 Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tri-peptide formé dans l'ordre des acides aminés suivants : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Son pouvoir réducteur réside dans le groupement thiol (SH) de la cystéine. Le glutathion est présent au niveau du cytosol et du chloroplaste où il réagit avec l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et le radical hydroxyl en plus d'être utilisé comme coenzyme afin d'exploiter son pouvoir réducteur.

Les groupements thiols des acides aminés (cystéine et méthionine) sont des sites d'attaque des ERO. En prenant l'atome d'hydrogène du groupement thiol de la protéine, cela entraîne la formation d'un pont dissulfure intra ou intermoléculaire. Cette modification entraîne un changement de la structure tertiaire de la protéine et peut avoir des répercussions sur l'activité catalytique de l'enzyme (Mc Kersie et Leshem, 1994).

Le glutathion agit de deux façons, soit par l'activité de la glutathion S-transférase qui catalyse l'échange intermoléculaire des groupements thiols entre une protéine dont les thiols sont oxydés et le glutathion selon le mécanisme suivant :



Où P et P' sont des protéines.

Ou directement en réagissant comme une peroxydase:



Afin de régénérer le glutathion réduit (GSH), sa forme oxydée est réduite sous l'action de la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme coenzyme. Cette réaction fait également partie du cycle Halliwell-Asada (Figure 4.3).

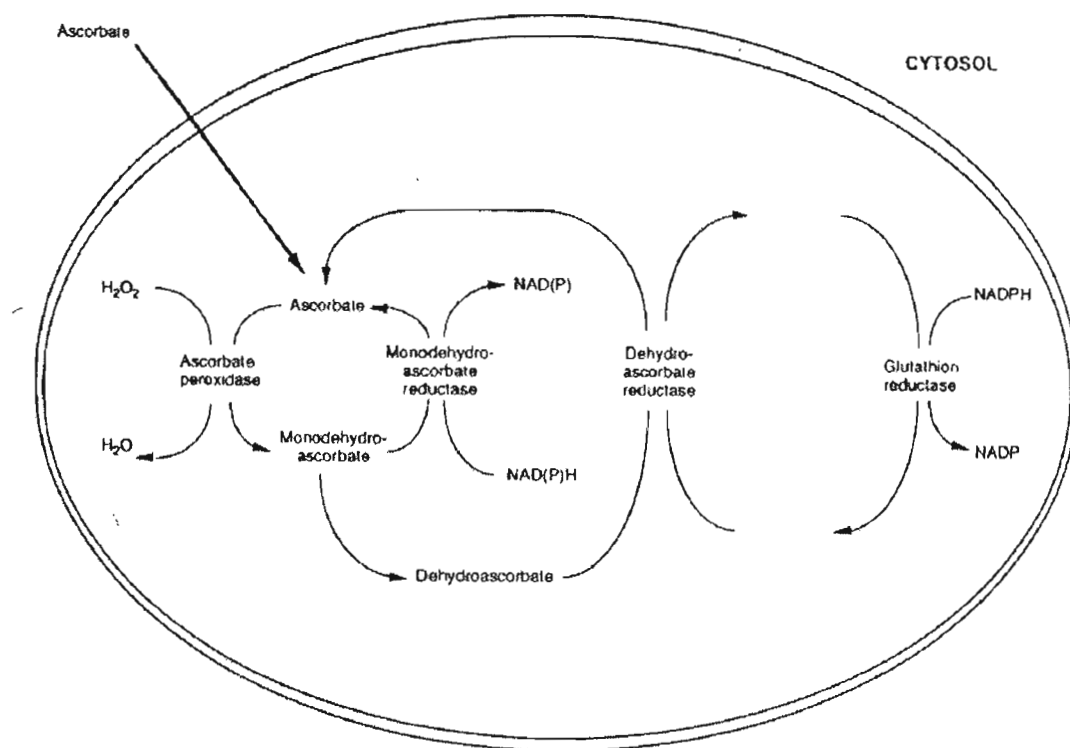


Figure 4.3 Recyclage de l'acide ascorbique (ascorbate) et du glutathion dans le cycle d'Haliwell-Asada (Tiré de Foyer et *al.*, 1994).

4.3.5 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont divisés en deux familles : les carotènes qui sont formés de 40 atomes de carbone et les xanthophylles qui, en plus, comportent un ou deux atomes d'oxygène. Au niveau du chloroplaste, les caroténoïdes, en plus de capter l'énergie lumineuse (Figure 1.5) protègent les photosystèmes de plusieurs façons :

1. Le cycle des xanthophylles permet de dissiper l'excès d'énergie absorbée par les molécules de chlorophylles qui n'est pas utilisée pour le transport d'électrons (Demmig-Adams, 1990; Pfüdel et Bilger, 1994).
2. Les caroténoïdes réagissent avec la chlorophylle triplet afin d'empêcher la formation d'oxygène singulet.
3. Les caroténoïdes sont capables de réagir directement avec l'oxygène singulet pour ensuite dissiper l'énergie sous forme de chaleur.
4. Les caroténoïdes réagissent avec les produits de peroxydation lipidiques au niveau membranaire afin de protéger les photosystèmes.

Le déséquilibre entre les ERO et les facteurs antioxydants est provoqué par des facteurs de stress d'ordre naturels ou anthropiques (Lichtenthaler, 1996). Donc, lorsque les défenses antioxydantes ne sont plus efficaces, les dommages oxydatifs deviennent plus importants. Les ERO endommagent les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Lorsque ce déséquilibre est trop grand, la mort cellulaire s'en suit. Cependant, avant cela, la cellule peut émettre une réponse à ce stress oxydatif. En effet, en réponse à un stress causé par des métaux lourds, la cellule végétale peut synthétiser des chélateurs tels que les phytochelatines, la métallothionéine et la thioredoxine (Cobbett et Goldsbrough, 2002). Les phytochelatines sont des petits peptides entre 5 et 11 acides aminés riches en cystéine qui sont formés de la condensation entre l'acide glutamique et la cystéine et dont la synthèse implique le glutathion. Pour ce qui est des métallothionéines et des thioredoxines, leur synthèse se fait de *novo*, à partir de leurs mRNA. De plus, les mécanismes de chélation diffèrent d'un peptide à l'autre (Steffens, 1990). Or, l'augmentation de la teneur en thiols dans la cellule peut être associée à l'induction d'un stress oxydatif.

CHAPITRE V

LA PROBLÉMATIQUE

Les métaux lourds sont des métaux naturellement présents dans les roches et les sols dont la densité excède $4,5 \text{ g/cm}^3$. Ils sont également libérés dans l'environnement par l'activité humaine et par l'érosion. En général, ils ne se transforment pas en d'autres éléments et, par conséquent, persistent dans l'environnement. Ils sont présent dans l'environnement sous différents états d'oxydation et de coordination qui sont directement liés à leur degré de toxicité (Pinto et *al.*, 2003). Dans cette catégorie se retrouve notamment le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cadmium (Cd), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) le chrome (Cr), le nickel (Ni), etc. Bien que toxiques à forte concentration, le Cu et le Zn sont des micronutriments essentiels pour l'activité de plusieurs enzymes et font partie de molécules jouant des rôles clés au niveau de la photosynthèse et du transport d'électrons (Raven et *al.*, 1999). Ils sont donc nécessaires aux écosystèmes globaux, ce qui n'est pas le cas du Hg, Pb et du Cd. Au cours de la dernière décennie, le Cd et le Hg ont suscité une attention particulière, en raison de leur importante diffusion et de leur toxicité. En 1996, le cadmium était classé au septième rang des substances à risque selon Agency for Toxic Substances and Disease Registry et U.S. Environmental Protection Agency (Fay et Mumtaz, 1996).

Le cadmium est utilisé sous forme de métal ou en liaison avec des carbonates, sulfates et phosphates. Il est présent dans les combustibles fossiles, le revêtement de nombreux appareils ménagers mais aussi dans l'outillage, les boulons, clous et vis. Il sert dans la fabrication des matières plastiques, les pneus de voiture, les batteries et l'huile de moteur. Dans l'agriculture, les principales sources de cadmium sont les engrais de phosphates et les boues d'épuration. L'utilisation du cadmium dans divers procédés industriels tels les manufactures de plastique, l'électroplacage, les batteries Ni-Cd, la fabrication de différents pigments (Alloway, 1995; Dudka et Adriano, 1997), l'industrie minière et les fonderies (Nriagu et Pacyna, 1988) a affecté toujours plus d'écosystèmes (Macfarlane et Buchett, 2001). La pollution environnementale aux métaux a augmenté avec l'essor des activités

minières et industrielles à la fin du 19^e siècle (Pinto et *al.*, 2003). Depuis, plusieurs problèmes liés à la toxicité se sont manifestés chez les humains. Les dommages du cadmium causés aux humains sont multiples et se situent notamment au niveau des reins (Buchet et *al.*, 1980; Hellstrom et *al.*, 2001), ils peuvent causer de l'osteomalacie (Nogawa et Kido, 1993; Tsuritani et *al.*, 1996) et le développement du cancer de la prostate (Desi et *al.*, 1998). De plus, la contamination des humains au cadmium est due à la consommation d'aliments qui ont accumulé le métal lourd (Moir et Thornton, 1989; Lehoczy et *al.*, 1998) et à la fumée de cigarette qui représente 75 % de l'apport quotidien tolérable en cadmium. Dans ce contexte, il devient important d'utiliser des tests de biotoxicité afin de déterminer les effets au niveau cellulaire. Il est ainsi possible de déterminer les effets et les impacts potentiels sur l'écosystème, de prévenir les dommages et d'établir les seuils de tolérance du produit toxique (Laube et *al.*, 1980; Chapman et *al.*, 1996). La capacité de certaines espèces végétales d'accumuler les métaux lourds par différents mécanismes cellulaires cause leur transfert dans la chaîne alimentaire.

Les effets du cadmium sur les plantes se traduit par la réduction du taux de la photosynthèse, l'inhibition de la croissance, le brunissement des racines, la chlorose (Kahle, 1993), la diminution de l'apport en eau et nutriments et mène à la mort cellulaire (Di Toppi et Gabrielli, 1999). Les mécanismes menant à la toxicité des métaux lourds sont nébuleux (Faller, 2005). De façon générale, la toxicité des métaux lourds est attribuable en partie à un stress oxydatif des systèmes cellulaires (Quinlan et *al.*, 1988; Robinson et *al.*, 1994; Okamoto et Colepicolo, 1998; Adonaylo et Oteiza, 1999; Wang et Shi, 2001). Ce stress oxydatif crée des dommages non spécifiques aux protéines, aux lipides et autres biomolécules (Stohs et *al.*, 2000; Schützendübel et *al.*, 2001). Donc, les effets du cadmium au niveau cellulaire sont multiples : il défait les ponts disulfure, altère la structure des protéines, change l'état d'oxydoréduction de la cellule, interfère dans l'apport d'ions métalliques essentiels, affecte le transport et le métabolisme (Brennan et Schiestl, 1996; Chaoui et *al.*, 1997; Ouariti et *al.*, 1997; Nies, 1999; Sandalio et *al.*, 2001). Ces effets ont des conséquences sur la concentration de chlorophylle, sa biosynthèse et la photosynthèse. Le cadmium a des effets tant du côté oxydant que réducteur du photosystème II et il affecte tant le transport d'électrons que les protéines de l'appareil photosynthétique.

La disponibilité des nutriments, notamment les sources d'azote, augmente de façon dramatique l'habilité des algues d'accumuler les métaux lourds (Wang et Dei, 2001a,b) suggérant ainsi l'augmentation de métaux lourds entrant dans la chaîne alimentaire à proximité des terres agricoles enrichies par les engrais. Ainsi, durant les dernières années, il s'est développé des méthodes de bioremédiation afin de contrôler la concentration de polluant dans les eaux. Ces techniques utilisent des espèces biologiques (algues, plantes ou microorganismes) qui ont la capacité d'accumuler certains métaux, à différents degrés de tolérance (Cervantes et *al.*, 2001; Jordanova et *al.*, 1999). Donc, les végétaux ont des moyens de défenses en réponse à l'exposition aux métaux lourds. D'abord, la paroi cellulaire possède des sites chargés négativement qui ont une haute affinité pour les cations métalliques (Collard et Matagne, 1990) et elle représente la première protection contre les métaux lourds. Bien que la composition de la paroi cellulaire varie d'une espèce végétale à l'autre, elle comporte de 25 à 30 % de cellulose, 15-25 % d'hémicellulose, 35 % de pectines et 5-10 % de glycoprotéines (Wang et Evangelou, 1995). La paroi cellulaire de l'algue verte *Chlamydomonas* ne contient pas de cellulose mais est riche en glycoprotéines (Voigt, 1988). En fait, ce sont les groupements anioniques abondants des fonctions de type acide carboxylique contenues dans les pectines et les glycoprotéines qui ont une forte affinité pour les ions métalliques (Crist et *al.*, 1994; Haynes, 1980). Il semble que les pectines de la paroi cellulaire soient responsables de 70 à 90 % de la capacité des échanges cationiques tandis que les glycoprotéines interviennent pour 10 à 30 % (Macfie et Welbourn, 2000). Malgré cette première défense, les ions métalliques se retrouvent dans les plantes et cellules végétales car ils utilisent les canaux calciques, des canaux de la famille ZIP (zrt-irt like-protein) et des transporteurs de métaux divalents (DMT) (Rosakis et Köster, 2003). Au niveau intracellulaire, les phytochélatines, de petits peptides riches en groupements thiols, ont été montrées comme les meilleurs chélateurs d'ions métalliques et responsables de la séquestration de plus de 70 % du cadmium intracellulaire (Hu et *al.*, 2001). De plus, des métaux lourds tels le mercure et le cadmium induisent la transcription de gènes menant à l'expression de thioredoxines, protéines impliquées dans la détoxification cellulaire (Lemaire et *al.*, 1999; Lemaire et *al.*, 2002). Il faut également mentionner l'importance du glutathion, un tripeptide représentant la source majeure de thiols réduits et qui joue un rôle important lors de stress oxydatif. Un autre mécanisme que les plantes et algues utilisent pour la détoxification des métaux lourds repose sur la production de proline (Delauney et Verma,

1993; Schat et *al.*, 1997; Shah et Dubey, 1998; Mehta et Gaur, 1999; Verma, 1999). Bien que le mécanisme ne soit pas clairement défini, l'accumulation de proline chez les espèces végétales stressées aux ions métalliques est associée à la réduction des dommages aux membranes et aux protéines (Alia et *al.*, 1997; Shah et Dubey, 1998, Verma, 1999). De plus, d'autres petites molécules telles l'acide ascorbique et les caroténoïdes jouent un rôle important dans la régulation du stress oxydatif.

Afin d'étudier les effets du cadmium au niveau de la photosynthèse, du transport d'électrons et de la biosynthèse de la chlorophylle, le bioindicateur choisi fut l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Il s'agit d'une espèce végétale qui est intensément utilisée pour la recherche des procédés physiologiques tels la photosynthèse, la respiration, l'assimilation des nutriments et la motilité flagellaire. Elle a une taille d'environ 10 μm , possède 17 chromosomes, un seul chloroplaste et deux flagelles. C'est une algue qui possède un petit cycle de vie et qui est facile à manipuler, ce qui en fait un outil important pour les études du génome. En effet, depuis une quinzaine d'années de nombreuses technologies moléculaires ont été appliquées à *Chlamydomonas*. De plus, les développements avec le projet génomique de cette algue fait en sorte qu'elle offre tous les outils nécessaires à la recherche sur la compréhension de la toxicité et les phénomènes de tolérances aux ions métalliques. Plusieurs souches mutantes sont disponibles ce qui confère à cette algue certaines particularités. En effet, il est possible d'obtenir des souches résistantes à certains métaux lourds ou certains herbicides, dépourvues de certaines enzymes tel que la protochlorophyllide oxydoréductase ou manquant certains composants, telle que la paroi cellulaire.

Les objectifs de cette étude étaient, dans un premier temps, d'évaluer les effets du cadmium sur l'activité photosynthétique de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. De plus, les mutants de cette algue verte ont permis d'évaluer le rôle de la paroi cellulaire sur la toxicité du cadmium et d'évaluer les effets sur la biosynthèse de la chlorophylle et la formation de photosystèmes actifs. Les mutants utilisés furent, d'une part, dépourvus de paroi cellulaire, et d'autre part, incapables de synthétiser la chlorophylle à l'obscurité. La cytométrie de flux, la fluorescence chlorophyllienne et la fluorescence des pigments à basse température (77°K) ont été les approches utilisées.

CHAPITRE VI

MATÉRIELS ET MÉTHODES

6.1 Le matériel biologique

L'espèce végétale utilisée était *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 6.1), une algue verte unicellulaire de la famille des chlorophyceae. Il existe près de 600 espèces de cette algue provenant de différents environnements aquatiques (eaux marines et douces). Ces cellules se divisent selon 2 types de cycles, sexué et asexué. Le noyau contient 17 chromosomes et forme un génome de 100 millions de paires de bases. Il est situé au centre de la cellule et est entouré par l'unique chloroplaste en forme de croissant de lune. La cellule contient également un seul pyrenoïde contenant l'amidon produit par la photosynthèse. De plus, l'organisation des complexes pigments-protéines de l'appareil photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* est très similaire à celui de plantes supérieures (Harris, 1989). Toutes les souches utilisées dans ce travail proviennent du «Chlamydomonas Genetic Center» de l'Université Duke en Caroline du Nord.

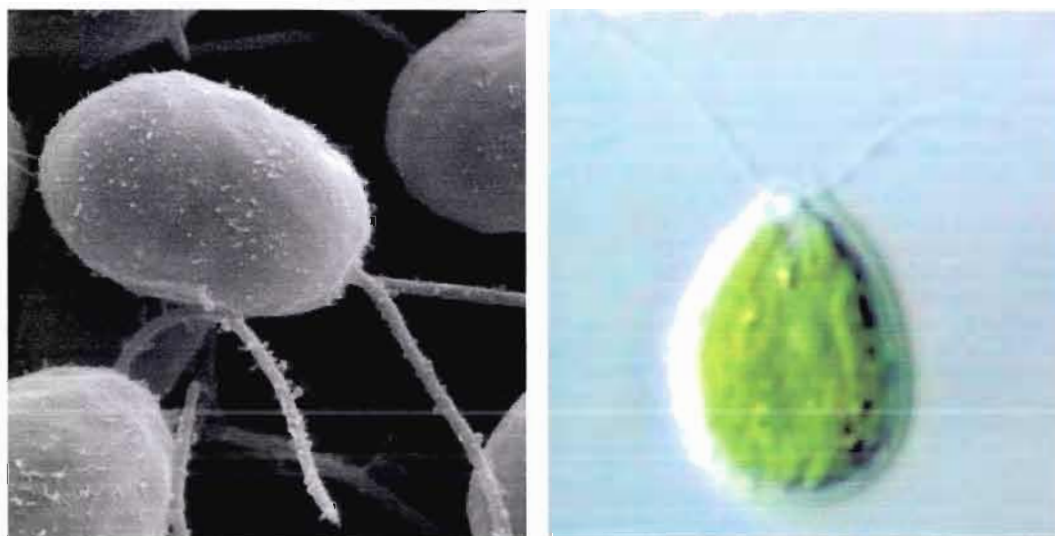


Figure 6.1 Image microscopique de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

6.2 Les effets des ions de cadmium sur la croissance et l'activité photosynthétique

6.2.1 Les conditions de culture

L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125 WT mt+) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400 CW15 mt+) ont été cultivées dans un Erlenmeyer de 2 L contenant un litre de milieu «high salt» modifié (HSM) (Tableau 6.1) (Sueoka, 1967), dont le pH est 6,84 à une température de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ et sous une illumination constante de 100 $\mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Sylvania GroLux). Ces cultures cellulaires sur plaque agitatrice étaient continuellement aérées via une pompe d'aquarium (Hägen, Maxima) munie de filtres à seringues (Millipores) aux extrémités afin de fournir aux algues une concentration de CO_2 optimale de façon stérile. En vue d'une constance dans la qualité du matériel biologique, ces cultures mères étaient renouvelées deux fois par semaine en utilisant une densité cellulaire de départ de 3×10^5 cellules par millilitre. Cette densité cellulaire était déterminée à l'aide d'un hémacytomètre et de la turbidité du milieu évaluée par la densité optique à 750 nm (Harris, 1989). Puisque la souche de type sauvage est une cellule flagellée, nous avons recours à la fixation par l'éthanol afin de pouvoir compter adéquatement le nombre de cellules sur l'hémacytomètre. De plus, les cellules étaient régulièrement cultivées sur des milieux gélosés contenant 1,7% d'agar-agar (Anachemia, USA) et une colonie était ensemencée afin de s'assurer de la stérilité du matériel biologique.

Tableau 6.1 Concentration des nutriments dans le milieu HSM.

Composés chimiques	Concentration (M)
NH_4Cl	4.67×10^{-3}
K_2HPO_4	8.27×10^{-3}
KH_2PO_4	5.44×10^{-3}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.06×10^{-5}
CaCl_2	3.40×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.85×10^{-6}
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9.85×10^{-7}
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.35×10^{-7}
H_3BO_3	3.00×10^{-8}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.00×10^{-8}
ZnCl_2	2.41×10^{-8}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.09×10^{-8}
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.04×10^{-11}

6.2.2 Traitements au chlorure de cadmium (CdCl_2)

Afin de s'assurer d'une constance dans les conditions de traitement des algues, la densité cellulaire et la concentration en chlorophylle totale de la culture mère étaient contrôlées. Des échantillons d'algues étaient prélevés dans leur phase exponentielle de croissance représentant une densité cellulaire de 3×10^6 cellules/mL et une concentration en chlorophylle totale de $4 \mu\text{g/mL}$. Le dosage de la chlorophylle se faisait par extraction dans le méthanol selon la méthode de Lichtenthaler (1987) : trois échantillons d'un mL de la culture mère étaient centrifugés à 100 g pendant 10 min à 4°C . Les culots étaient alors resuspendus dans 2,5 mL de méthanol 100% et mis dans un bain-marie à 65°C . Ensuite, les échantillons étaient refroidis à température de la pièce pendant cinq minutes et centrifugés selon les mêmes modalités que précédemment. La densité optique du surnageant était évaluée à 652,6

et 665,2 nm (Spectrophotomètre Lambda40, Perkin Elmer, USA) et la concentration de chlorophylle totale en $\mu\text{g/mL}$ était calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Chl}_{\text{totale}} = (24,93 \times A_{652,4} + 1,44 \times A_{665,2}) \times 5/2 \quad (\text{Lichtenthaler, 1987})$$

Le milieu de traitement est constitué du milieu de culture, des concentrations de CdCl_2 et d'algues provenant de la culture mère pour un volume final de 100 mL dans un erlenmeyer de 250 mL. Or, la biomasse de départ est d'environ 5×10^5 cellules/mL ce qui correspond à 8 μg de chlorophylle totale et un volume de la culture mère d'environ 1,7 mL lorsque l'état optimal est atteint. Les concentrations testées de CdCl_2 varient entre 0 et 25 μM (0, 5, 10, 15 et 25 μM). Les traitements sont préparés à partir d'une solution stock de 1 mM de CdCl_2 dissout dans l'eau nanopure. Durant cette période (48 h), la variation du pH est négligeable et passait de 6,84 à 6,88. Les conditions de traitement (température et luminosité) ont été similaires à celles de la culture mère. Les échantillons d'algues ont été exposés aux effets toxiques du cadmium pendant 24 et 48 heures. La biomasse et le taux de viabilité cellulaire ont été déterminés par cytométrie de flux. Par la suite, l'activité photosynthétique a été évaluée selon une méthode mesurant la fluorescence chlorophyllienne.

6.2.3 La cytométrie de flux

Différents paramètres comme la taille, la granulosité des cellules et l'émission de fluorescence ont été évalués à partir d'un FacScan (Becton Dickinson Instruments). Ce cytomètre comporte un laser à argon qui excite à une longueur d'onde de 488 nm et mesure l'émission de la fluorescence cellulaire par trois canaux. La fluorescence verte est évaluée à 530 nm au canal FL1, la fluorescence jaune est évaluée à 575 nm au canal FL2 et finalement, la fluorescence rouge est évaluée à 650 nm au canal FL3. La fluorescence émise peut être intrinsèque à la cellule (auto fluorescence) ou bien émise via un marqueur fluorescent. L'acquisition et l'analyse des résultats se fait par le logiciel CellQuest.

Le compte cellulaire

Le dénombrement cellulaire a été effectué selon la méthode de Robins et Bedo (1994) qui utilise des microbilles fluorescentes comme standard interne. Ainsi, pour 190 μL de chaque échantillon est ajouté 10 μL de billes fluorescentes (Microspheres, USA) dont la concentration initiale est de 2×10^6 billes/mL. Il est possible d'évaluer la concentration cellulaire des échantillons en tenant compte du pourcentage de billes et d'algues, donné par le cytomètre, selon l'équation suivante :

$$C_{\text{algues}} = (\% \text{ algues} / \% \text{ billes}) \times C_{\text{Billes}}$$

La viabilité cellulaire

Cette technique utilise le marqueur de viabilité 5-chlorométhylfluoresceine diacétate (CMFDA, Molecular Probes, USA). Cette molécule a la propriété de diffuser librement à travers la membrane des cellules. Une fois à l'intérieur de la cellule, les estérases non spécifiques qui sont fonctionnelles cliveront la fonction ester de la molécule, ce qui rendra le composé fluorescent. Par la suite, la fonction chlorométhyl du CMFDA réagira avec les groupements thiols libres intracellulaires, notamment le glutathion (Figure 6.2). Les modalités d'utilisation fournies par le fabricant ont été utilisées et préconisent une concentration finale de 10 μM du marqueur de viabilité. Or, un volume de 10 μL de la solution stock (200 μM) dissoute dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est ajouté à 190 μL de l'échantillon. Un temps d'incubation de 30 minutes à l'obscurité est nécessaire à la réaction. Il est alors possible de distinguer la proportion de cellules viables puisque les cellules mortes ne possèdent aucune activité estérase. De plus, le marqueur de fluorescence CMFDA n'interfère pas avec l'auto fluorescence cellulaire. En effet, le marqueur fluoresce dans le vert et est capté par le canal FL1 tandis que la fluorescence chlorophyllienne est rouge et est captée par le canal FL3.

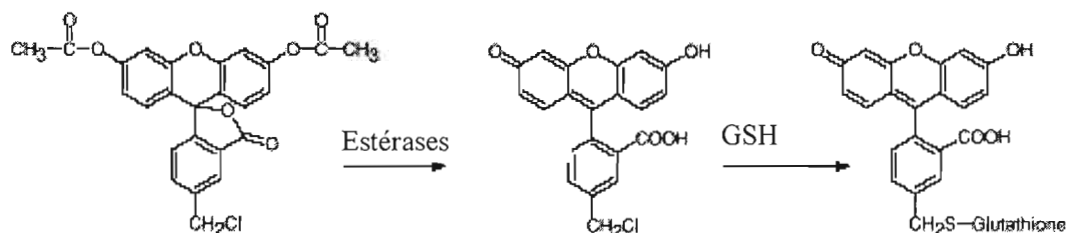


Figure 6.2 Réaction moléculaire du CMFDA avec les estérases et les groupements thiols protéiques. L'ordre des réactions peut être inversé.

6.2.4 La fluorescence chlorophyllienne

Le Plant Efficiency Analyser (PEA) (Hansatech Ltd, King's Lynn, Norfolk, Royaume-Unis) est composé de diodes électroluminescentes (LED) qui émettent à une longueur d'onde de 650 nm. La fluorescence induite par la lumière d'excitation est enregistrée toutes les 10 μ s. Avant d'effectuer les mesures de fluorescence, les échantillons ont été adaptés 20 minutes à l'obscurité pour que les transporteurs d'électrons soient dans leurs états oxydés. De plus, la concentration de chlorophylle est mesurée telle que décrit précédemment. Si la concentration de chlorophylle de l'échantillon est trop faible (inférieure à 4 μ g/mL), les cellules sont concentrées par centrifugation et le facteur de concentration est pris en compte dans l'équation de Lichtenthaler (1987). Ensuite, un volume correspondant à 5 μ g de chlorophylle est filtré (Millipore, Fisher Scientifics, #AP2001300). Le filtre est placé dans le porte échantillon de l'appareil. Un flash lumineux saturant d'une intensité de 1500 μ moles de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ est appliqué pendant 6 sec et la fluorescence émise par l'échantillon est enregistrée à une longueur d'onde de 690 nm.

Les spectres sont ensuite normalisés au point O de la cinétique rapide, soit après 50 μ s d'exposition au flash lumineux, ce qui correspond à la fluorescence de base de la chlorophylle. Les transitions JIP sont estimées aux temps respectifs de 2, 30 et 300 ms d'exposition au flash saturant (Strasser et al., 1999). À partir des niveaux de fluorescence mesurés à ces transitions, différents paramètres liés à l'activité de l'appareil

photosynthétique sont calculés. Il s'agit du rendement photochimique (Φ_{PSII}), de la taille des antennes collectrices de lumière (ABS/CR), de la taille du «pool» de plastoquinones (qPQ) et du «quenching» associé au gradient de protons de la membrane du thylacoïde (qE_{max}) (Strasser et al., 1999; Krüger et al., 1997).

6.3 Les effets des ions de cadmium sur la biosynthèse de la chlorophylle et la formation des photosystèmes

L'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type mutant (CC-1168 y1 mt+) possède une délétion au niveau nucléaire qui empêche la biosynthèse de la chlorophylle via l'enzyme POR indépendante de la lumière. Cette mutation mène au phénotype communément appelé «yellow in the dark». Ainsi, l'algue se comporte comme une plante supérieure à l'obscurité et elle sera étiolée. C'est-à-dire qu'elle accumulera la PChlide à l'obscurité et synthétisera la chlorophylle lorsqu'elle sera exposée à la lumière. Cette algue a besoin de conditions particulières de croissance. Puisque le processus de photosynthèse n'a pas lieu, l'algue doit utiliser une source de carbone alternative dans le milieu nutritif.

6.3.1 Les conditions de culture

Les conditions de la culture mère sont spécifiques. Dans ce travail, le milieu Tris-acétate-phosphate (TAP) était utilisé et sa source de carbone majeure est l'acétate (Tableau 6.2) (Harris, 1989). L'intensité lumineuse ambiante est de $0,5 \mu\text{mole de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En effet, les cellules ne sont pas à l'obscurité complète car il a été montré que tant la lumière que l'obscurité favorisent l'apparition de cellules révertantes (Figure 6.3a) (Wang, 1979). Donc, cette faible intensité lumineuse a été établie comme optimale puisque la biosynthèse de la chlorophylle et le taux de réversion sont faibles. De plus, afin de conserver la qualité optimale de l'algue mutante, une dilution quotidienne est requise. Ainsi, chaque jour, la densité cellulaire est ramenée à 1×10^6 cellules/mL à l'aide d'un compte cellulaire sur hémacytomètre (Figure 2.3b) (Wang, 1979). Cette culture mère est alors utilisée pour les traitements. Tout d'abord, afin de faire augmenter le ratio PChlide/Chlide, les algues sont mises à l'obscurité pour une période de six jours avec des dilutions quotidiennes. Ces

dilutions ont pour effet de diminuer le nombre de cellules ayant été en contact avec la lumière de faible intensité. En plus de diminuer le taux de Chlide, l'absence de lumière favorise l'accumulation de PChlide puisque la seule enzyme POR fonctionnelle nécessite la lumière. Donc, après six jours, l'augmentation du ratio PChlide/Chlide est un bon signe de l'obtention de cellules étiolées (Figure 6.4). Il est à noter que toutes les manipulations des cellules de cette souche se font sous une lumière verte de faible intensité puisque cette lumière ne favorise pas la phototransformation de PChlide en Chlide par l'enzyme POR.

Tableau 6.2 Concentrations des nutriments présents dans le milieu TAP.

Composés chimiques	Concentration (M)
TRIS	2.00×10^{-2}
CH_3COOH	1.72×10^{-2}
NH_4Cl	6.72×10^{-3}
K_2HPO_4	5.75×10^{-4}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.06×10^{-4}
KH_2PO_4	4.05×10^{-4}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.40×10^{-4}
H_3BO_3	1.80×10^{-4}
Na_2EDTA	1.30×10^{-4}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.60×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.50×10^{-5}
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.80×10^{-5}
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.9×10^{-6}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6.67×10^{-6}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6.29×10^{-6}

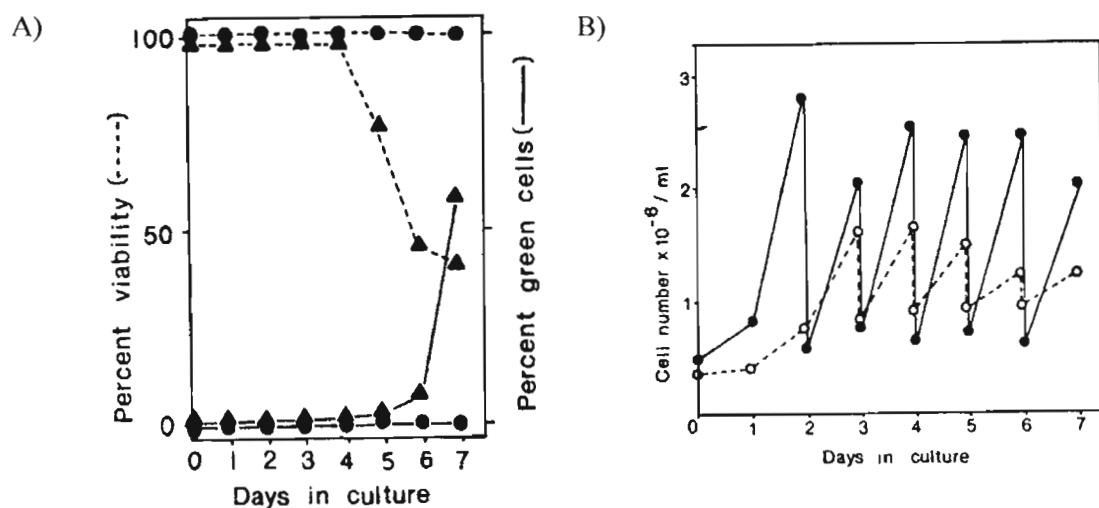


Figure 6.3 Conditions de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* y-1 : (A) viabilité et degré de réversion du phénotype lorsque cultivé à 0,5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cercles) et à l'obscurité (triangles); (B) Dilution quotidienne des cellules dans le milieu TAP liquide lorsqu'elles sont cultivées à 0,5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cercles pleins) et à l'obscurité (cercles vides) (Tiré de Wang 1978).

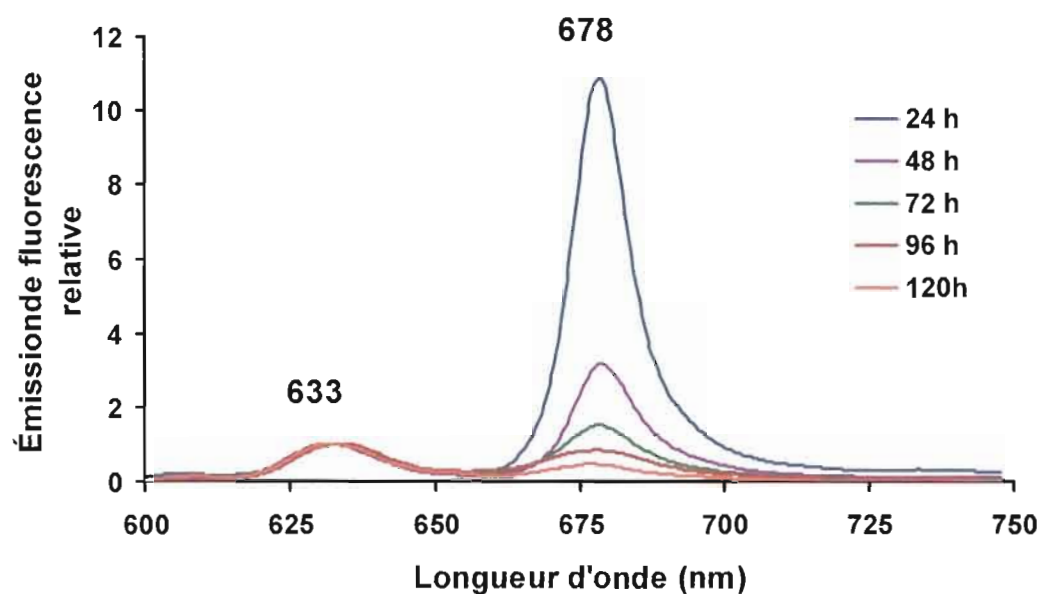


Figure 6.4 Augmentation du ratio PChlide-F633/ Chlide-F678 selon la durée de présence à l'obscurité pour les cellules *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1168 y1). Normalisé à 633 nm.

6.3.2 Les traitements au chlorure de cadmium

Un traitement aigu, soit une plus forte concentration mais un temps d'exposition court, est de mise afin d'atténuer les risques de diminution de la biomasse. Ainsi, après six jours à l'obscurité, les cellules sont divisées en deux échantillons et un seul sera mis en présence de 100 μM de CdCl_2 pendant six heures. L'autre échantillon sert de témoin.

6.3.3 Détermination des effets du CdCl_2 sur la phototransformation de PChlide

La fluorescence des pigments à 77°K est la méthode la plus répandue afin d'évaluer l'activité de photoconversion de PChlide en Chlide via l'activité enzymatique de POR. Pour ce faire, les algues ont été concentrées à 1×10^7 cellules/mL afin d'obtenir un signal de fluorescence adéquat. Par la suite, du sorbitol était ajouté pour une concentration finale de 0,3 M afin de prévenir la sédimentation des cellules en suspension. Des aliquotes étaient prélevés et mis dans une tige de verre d'une circonférence de 1,4 mm. Les tiges étaient ensuite exposées à la lumière (100 $\mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) pour diverses périodes de temps (0, 30, 60, 90, 120 et 180 s). Immédiatement à la fin du temps d'exposition, les tiges ont été submergées dans l'azote liquide ce qui met un terme à toute activité enzymatique.

Pour la formation des photosystèmes, les temps d'expositions à la lumière sont plus longs soit de 30 minutes à 4 heures. C'est pourquoi les cellules étaient d'abord centrifugées et resuspendues dans un milieu frais avant d'être exposées à la lumière (100 $\mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Le temps d'exposition échu, les cellules étaient centrifugées et concentrées à 1×10^7 cellules/mL et le sorbitol a été ajouté à une concentration finale de 0,3 M. Les aliquotes ont ensuite été déposés dans une tige de verre et mis dans l'azote liquide jusqu'au moment d'effectuer les mesures spectroscopiques.

6.3.4 Les spectres de fluorescence

Afin de mesurer l'émission de fluorescence à 77°K, les tiges de verre contenant les échantillons étaient placées dans une cellule analytique et immergées dans l'azote liquide. Les spectres d'émission de fluorescence étaient enregistrés entre 600 et 750 nm en utilisant un spectromètre à luminescence équipé d'une chambre à basse température (LS 50-B,

Perkin Elmer, Norwalk, USA). Afin de diminuer l'effet des rayons lumineux non souhaités, un filtre vert limitait les rayons lumineux de la fenêtre d'excitation ($\lambda < 580$ nm, Oriel 59070, Stratford, USA) et un filtre rouge placé dans la fenêtre d'émission limitait les rayons lumineux émis ($\lambda > 600$ nm, Oriel 59512, Stratford, USA). La longueur d'onde d'excitation était de 436 nm et la vitesse du spectre était de 50 nm/min en utilisant la moyenne de sept scans.

Pour ce qui est des statistiques, le nombre de répétitions a été indiqué pour chaque figure ou tableau. À moins d'avis contraire, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au témoin. De plus, les écarts types sont présentés en pourcentage (% CV).

CHAPITRE VII

RÉSULTATS & DISCUSSIONS

7.1 Effets des ions cadmium sur la densité et la viabilité cellulaire

7.1.1 Effets inhibiteurs des ions cadmium sur la division cellulaire.

Dans cette partie, les effets du CdCl_2 sur la croissance et la viabilité cellulaire de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* après 24 et 48 heures de traitement seront présentés. De plus, l'effet de l'absence de la paroi cellulaire sur la toxicité de ce métal lourd sera discuté.

Lorsque *C. reinhardtii* a été exposée à l'effet du CdCl_2 , la densité cellulaire a diminué par rapport au témoin en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Pour les cellules de type sauvage (CC-125), la densité cellulaire a diminuée de 15 % par rapport au témoin pour la plus grande concentration testée de CdCl_2 (25 μM) après 24 h de traitement (Figure 7.1A). Cette diminution de la densité cellulaire atteint 39 % après 48 heures en présence de la même concentration d'ions cadmium. Il semble y avoir une diminution plus importante entre 10 et 15 μM alors que la densité cellulaire diminue de 20 %. Pour ce qui est de la souche mutante dépourvue de paroi cellulaire, la diminution de la densité cellulaire est nettement plus importante (Figure 7.1B). En effet, cette diminution est de 34 % par rapport à l'échantillon témoin après 24 heures de traitement à 25 μM de CdCl_2 . Bien que la tendance entre les deux souches cellulaires soit comparable à plus faibles concentrations après 24 heures, l'effet des concentrations 15 et 25 μM est plus grande chez les cellules mutantes dépourvues de paroi cellulaire. D'un autre côté, après un temps d'exposition de 48 heures, les effets sur la densité cellulaire sont beaucoup plus importants chez la cellule mutante, peu importe la concentration d'ions cadmium. Ainsi, la diminution de 4 % de la densité cellulaire de la souche de type sauvage par rapport à son témoin est négligeable face à celle de 23 % subie par les cellules mutantes pour une concentration de 10 μM de CdCl_2 . Cette diminution de la densité cellulaire de la souche mutante atteint plus de 70 % à la plus forte concentration à l'étude, soit 25 μM .

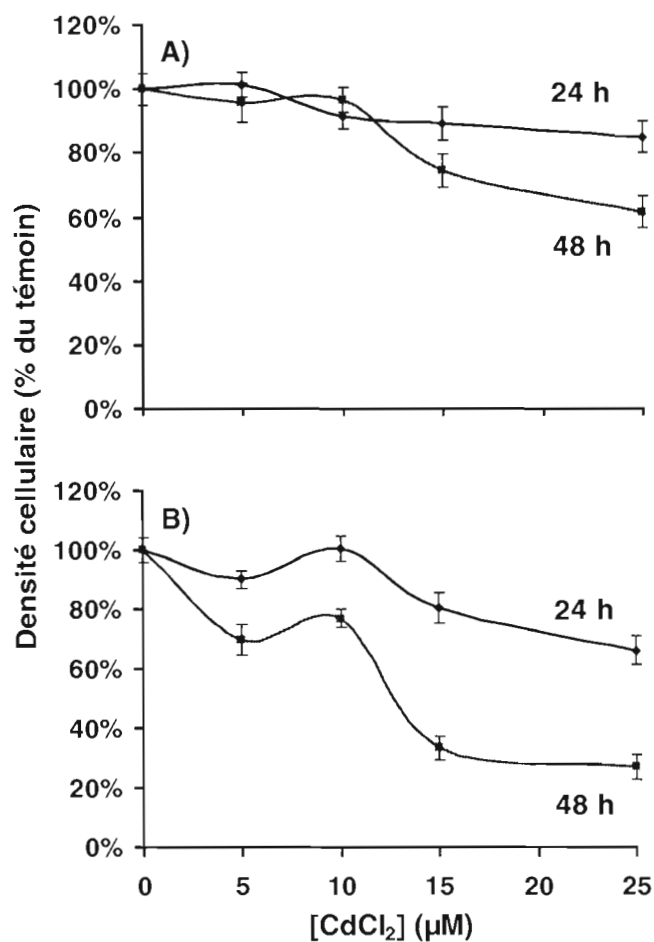


Figure 7.1 Effet toxique du chlorure de cadmium sur la densité cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures (n=3).

7.1.2 Effet toxique des ions cadmium sur la viabilité cellulaire

Le marqueur de viabilité Green-CMFDA (Molecular Probes, USA) a été utilisé pour évaluer la population de cellules viables dans les échantillons par cytométrie de flux. Pour ce qui est des cellules de type sauvage, le taux de viabilité est stable entre 5 et 25 µM d'ions cadmium (Figure 7.2A). En effet, le degré de viabilité cellulaire demeure à environ 90 % de la valeur du témoin pour ces concentrations après 24 heures de traitement. Suite à un temps d'exposition de 48 heures, il y a une légère tendance décroissante du niveau de viabilité

cellulaire en fonction de la concentration en chlorure de cadmium. Ainsi, à la plus forte concentration, 25 μM , les cellules viables représentent 75 % des cellules viables du témoin. Pour les cellules mutantes sans paroi cellulaire, il y a une plus forte diminution du taux de viabilité cellulaire pour les mêmes concentrations d'ions cadmium (Figure 7.2B). En effet, il y a une diminution constante du niveau de viabilité cellulaire en fonction de la concentration. Après 24 heures, pour 10 μM de CdCl_2 , il y a une baisse de 25 % du niveau de viabilité cellulaire. Au même temps d'exposition, la diminution atteint 40 % pour une concentration de 25 μM d'ions cadmium. Qui plus est, la diminution de cette viabilité s'intensifie après 48 heures en présence de ce xénobiotique. Ainsi, pour la plus faible concentration à l'étude, 5 μM , il résulte une diminution de 30 % par rapport au témoin. Cette inhibition de la viabilité cellulaire après 48 heures atteint près de 80 % pour la plus forte concentration d'ions cadmium à l'étude, soit 25 μM .

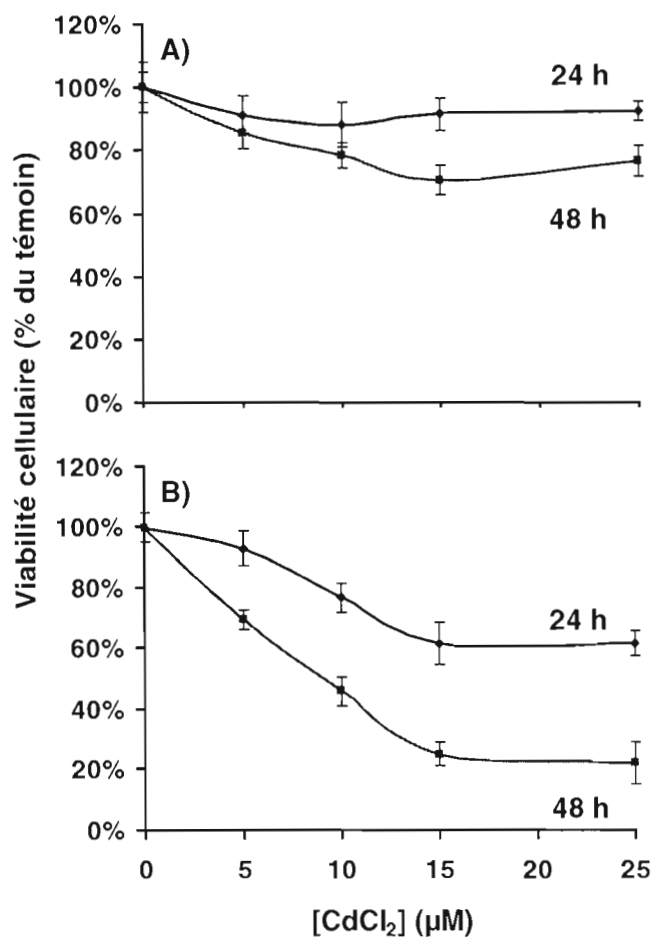


Figure 7.2 Effet toxique du chlorure de cadmium sur la viabilité cellulaire de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (A) et de type mutante dépourvue de paroi cellulaire (B) après 24 et 48 heures de traitement (n=3).

7.1.3 Effet des ions cadmium sur l'induction des groupements thiols intracellulaires.

En plus de la viabilité cellulaire, le marqueur Green-CMFDA permet l'évaluation de la présence de groupements thiols intracellulaires. Ainsi, plus la cellule viable possède des groupements thiols, plus elle est en mesure de conserver la molécule fluorescente au niveau intracellulaire. En effet, le lien de la molécule fluorescente avec une protéine l'empêche de sortir de la cellule en diffusant à travers la membrane vers le milieu extracellulaire. Or, il y a un lien direct entre l'intensité de fluorescence et la proportion de ces groupements thiols

intracellulaires ce qui se traduit par un plus grand déplacement des cellules viables sur l'axe du canal de la fluorescence verte, le canal FL1.

On peut constater que l'effet des ions cadmium sur la présence de groupements thiols après 24 heures de traitement est semblable pour les cellules de type sauvage (Figure 7.3A) et mutante (Figure 7.3B). Le niveau de groupements thiols diminue de près de 20 % en présence de 25 μM d'ions cadmium pour les deux souches cellulaires après 24 heures d'exposition. Cependant, le niveau de groupements thiols augmente de 150 % après un temps d'exposition de 48 heures pour les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ainsi, le niveau de ce groupement fonctionnel, attribuable aux protéines et petits peptides, augmente de près de 2,5 fois par rapport à celui du témoin pour les deux souches cellulaires à la plus forte concentration. La concentration de groupements thiols pour la souche mutante dépourvue de paroi cellulaire est plus grande que pour la souche sauvage aux plus faibles concentrations. Ainsi, pour une concentration de 10 μM de CdCl_2 , le niveau de thiols est près de 150 % pour la souche de type sauvage alors qu'il atteint 185 % pour les cellules mutantes par rapport à leur témoin respectif.

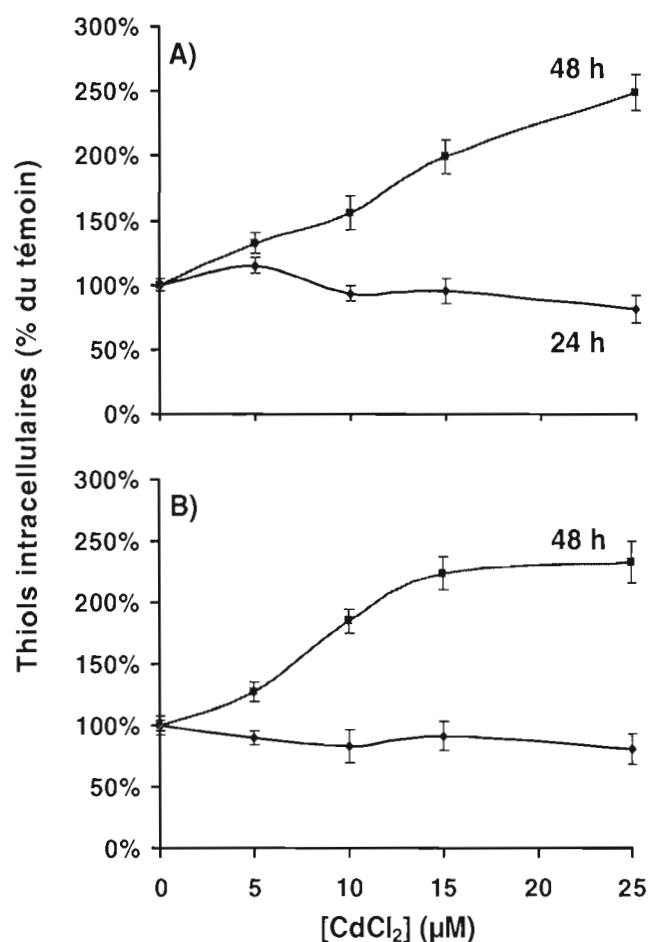


Figure 7.3 Variation des groupements thiols intracellulaires chez *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (B) en réponse à l'exposition au chlorure de cadmium après 24 et 48 heures de traitement (n=3).

7.1.4 Discussion sur les effets des ions cadmium sur la densité et la viabilité cellulaire

À ce jour, plusieurs publications relatent l'effet des métaux lourds sur la croissance d'espèces végétaux. D'autres informent sur les effets du cadmium sur la croissance de diverses espèces telles *Scenedesmus acutus* (Torricelli et al., 2004; Prasad et al., 1998). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, cette diminution de la croissance est probablement associée au fait que l'assimilation de nitrate diminue de près de 20% en présence de différents métaux lourds (Mosulén et al., 2003). Les résultats indiquent que la paroi cellulaire joue un rôle important dans la toxicité du cadmium en contrôlant son absorption

dans le système cellulaire. Il a été rapporté que la présence de la paroi cellulaire favorise l'adsorption de trois à cinq fois plus d'ions métalliques chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Kola et al., 2004; Macfie et Welbourn, 2000). Cette adsorption est due à la présence de groupements qui chélatent les cations à la surface de la paroi cellulaire. Plus il y a d'ions cadmium qui sont contenus à la surface de la cellule, moins grande est la concentration intracellulaire de ce xénobiotique. D'où la toxicité accrue au niveau du mutant sans paroi cellulaire et la diminution de la prolifération par rapport à la souche de type sauvage pour les mêmes concentrations et temps d'exposition.

Selon Watanabe et al. (2003), l'augmentation du niveau de thiols solubles s'explique du fait qu'il y ait un lien direct entre la concentration d'ions cadmium et la formation d'espèces réactives de l'oxygène, probablement le peroxyde d'hydrogène. Cependant, la diminution de la présence de groupements thiols de 20% après 24 heures pourrait être en lien avec l'augmentation de la concentration d'espèces réactives de l'oxygène au niveau cellulaire. En effet, la cellule utilise les thiols pour se défendre contre les métaux lourds. Cette diminution de groupements thiols libres reflète un déséquilibre de l'état d'oxydoréduction intracellulaire. D'un autre côté, l'importante augmentation du niveau de groupement thiols intracellulaires après 48 heures est l'élément de réponse au stress oxydatif que subit la cellule. Cette réponse physiologique est attribuable à l'augmentation de la synthèse de petits peptides riches en cystéine tels le glutathion et les diverses phytochelatines en présence de cadmium (Coppellotti, 1989; Mendoza-Cozalt et al., 2002; Torrielli et al., 2004). D'un autre côté, il semble que la synthèse de plus grosses protéines riches en cystéines telles la thiorédoxine et la métallothionéine soit en lien avec l'expression des gènes (Lemaire et al., 1999; Lemaire et al., 2002). Bien que le mécanisme de cette réponse cellulaire ne soit pas clairement défini, il semble que les groupements thiols constituent le moyen de défense le plus utilisé face au stress oxydatif en présence de métaux lourds. Ces peptides riches en groupement thiols chélatent et séquestrent les ions métalliques. Ceci a pour effet de diminuer le niveau d'ions métalliques libres responsables de la toxicité cellulaire.

7.2 Effets des ions cadmium sur les cinétiques de fluorescence chlorophyllienne

7.2.1 Les changements des cinétiques rapides en présence des ions cadmium

La fluorescence chlorophyllienne est un excellent biomarqueur et elle nous informe des changements de l'activité photosynthétique. Ces changements dans la cinétique de fluorescence sont induits lorsque l'espèce végétale est exposée aux effets de xénobiotiques ou à différents stress environnementaux. Dans notre étude, la fluorescence chlorophyllienne a été utilisée afin d'évaluer la toxicité du cadmium sur l'activité photosynthétique de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. Cet outil nous a également permis d'évaluer l'effet de la présence de la paroi cellulaire contre l'entrée et la toxicité des ions cadmium dans la cellule.

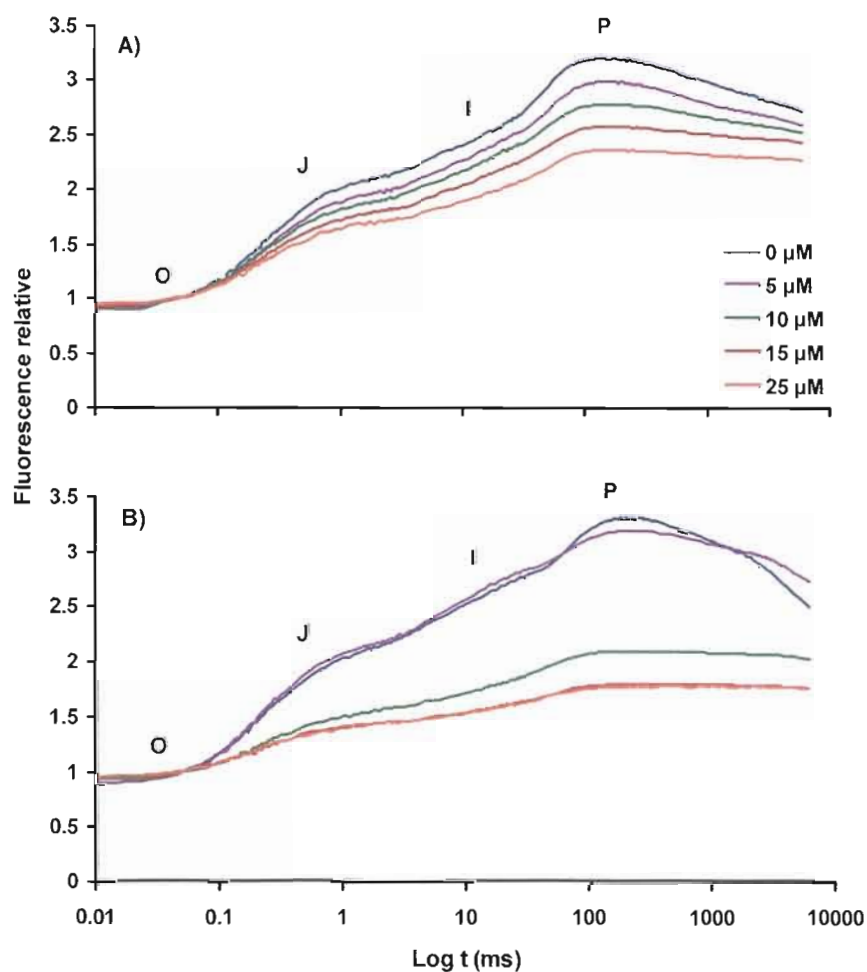


Figure 7.4 Changements dans les transitions rapides de la fluorescence chlorophyllienne pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) exposée au chlorure de cadmium pour une durée de A) 24 et B) 48 heures (n=3).

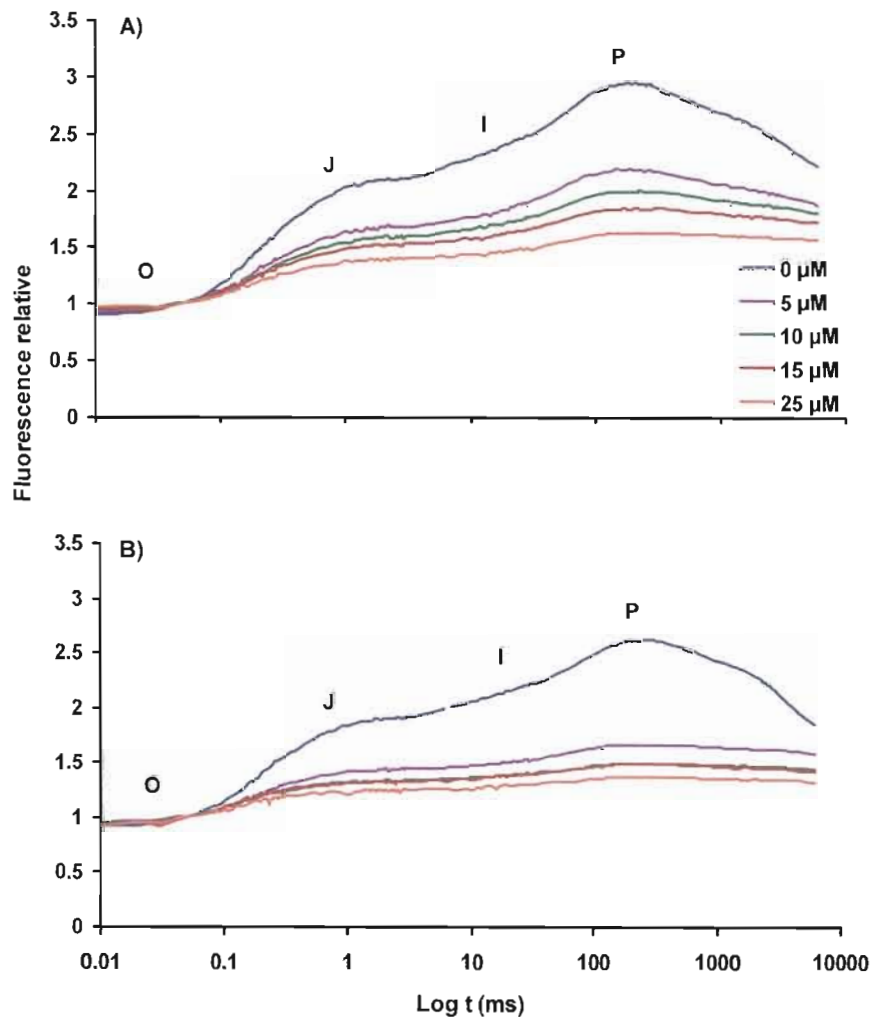


Figure 7.5 Changements dans les transitions rapides de la fluorescence chlorophyllienne pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type mutant dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) exposée au chlorure de cadmium pour une durée de A) 24 et B) 48 heures (n=3).

On peut constater qu'il y a une dépendance entre l'inhibition induite par différentes concentrations de cadmium et la baisse du niveau de fluorescence pour les cellules de type sauvage (Figure 7.4). Cette diminution de la fluorescence est une conséquence de l'inhibition de la photochimie du PSII des algues. Ces cinétiques indiquent que les ions du cadmium ont un effet sur le transport d'électrons du photosystème II au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Un élément important des cinétiques est qu'elles conservent toujours la même allure malgré la diminution du niveau de fluorescence induite. Ainsi, la

diminution de l'activité photochimique du PSII est directement liée à l'inactivation des centres réactionnels (Lazar, 2006).

Dans notre étude, nous avons comparé l'effet de la paroi cellulaire sur l'induction de toxicité du cadmium chez l'espèce *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous avons pu constater que le mutant de cette algue sans paroi cellulaire est plus sensible à l'effet toxique du cadmium (Figure 7.5). L'activité du PSII, indiquée par le rendement de fluorescence au niveau de la transition P, est plus rapidement inhibée pour les cellules sans paroi cellulaire comparé à l'algue de type sauvage. Ainsi, après 24 heures, une concentration de 5 μM de cadmium a un effet important sur l'activité photosynthétique du PSII. Nous pouvons constater que le niveau de fluorescence diminue en fonction de la concentration et du temps de traitement. Cependant, la forme des cinétiques de fluorescence chlorophyllienne demeure inchangée pour toutes les concentrations et temps d'expositions au cadmium. À partir de ces cinétiques de fluorescence chlorophyllienne, nous avons utilisé les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne afin d'évaluer les mécanismes de toxicité des ions cadmium.

7.2.2 Les paramètres de fluorescence chlorophyllienne comme indicateurs d'effets toxiques des ions de cadmium sur la photochimie du PSII

Les paramètres photosynthétiques suivants sont étudiés : Le rendement photochimique (F_v/F_m), l'absorption par centre réactionnel (ABS/CR), le «quenching» de la fluorescence relié au gradient de protons associé à la membrane du thylacoïde (qE_{max}) et le «quenching» de la fluorescence relié au «pool» de plastoquinones réduites (qPQ). Nous avons évalué chacun des paramètres sur la souche mutante dépourvue de paroi cellulaire afin de les comparer à la souche cellulaire de type sauvage. Cette comparaison des paramètres permet d'étudier l'effet de la paroi cellulaire sur la protection contre la toxicité induite par le cadmium.

Le rendement photochimique du PSII (ϕ PSII ou Fv/Fm)

Nous avons constaté que la diminution du rendement photochimique est dépendante de l'augmentation de la concentration d'ions cadmium et du temps des traitements (Figure 7.6). Chez la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, l'inhibition du rendement photochimique est de 15 % pour une concentration de cadmium de 25 μ M après 24 heures de traitement (Figure 7.6 A).

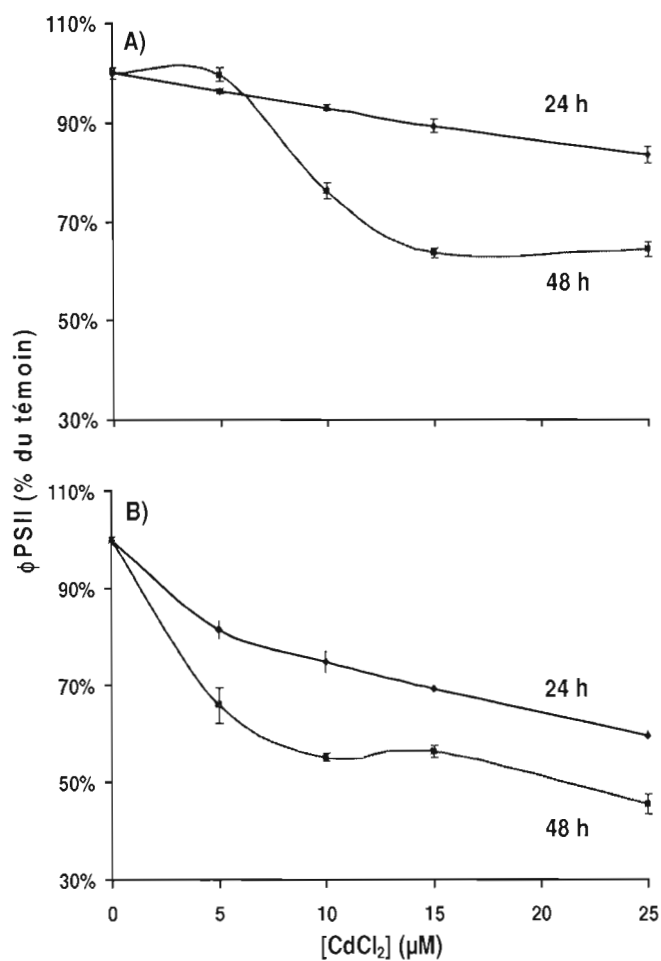


Figure 7.6 Effet du cadmium sur le rendement photochimique (ϕ PSII) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).

Après 48 heures d'exposition au cadmium, les concentrations entre 10 et 25 μM montrent une plus grande inhibition du rendement photochimique. Ainsi, pour 25 μM , cette diminution atteint près de 40 % par rapport au témoin.

Pour l'algue dépourvue de paroi cellulaire, la diminution est beaucoup plus importante et elle passe de 15 % pour une concentration de 5 μM à 40 % pour une concentration de 25 μM après seulement 24 heures de traitement aux ions cadmium (Figure 7.6B). Cependant, après 48 heures d'exposition à ce métal lourd, le degré d'inhibition atteint environ 55 % pour une concentration de 25 μM .

Donc, la diminution du rendement photochimique est la conséquence de l'inactivation des centres réactionnels du PSII. Il a été montré que l'inhibition d'un complexe de dégagement d'oxygène mène directement à la perte de l'activité photosynthétique du centre réactionnel du PSII (Martin et Ort, 1982). Donc, l'inactivation des centres réactionnels semble une conséquence de l'inhibition du complexe de dégagement d'oxygène.

La taille relative des antennes collectrices de lumière (ABS/CR)

Le changement de ABS/CR indique l'inactivation de certains centres réactionnels du PSII pendant que la quantité d'antennes collectrices de lumière reste inchangée (Force *et al.*, 2003). En effet, plus il y a de centres réactionnels inactifs, plus la taille relative des antennes collectrices de lumière attribuée à un centre réactionnel augmente. Lorsque la souche de type sauvage est exposée au cadmium pendant 24 heures, la taille des antennes collectrices de lumière par centre réactionnel augmente jusqu'à 25 % de plus que le témoin (Figure 7.7A). Après 48 heures d'exposition aux effets toxiques, cette augmentation atteint 75 % pour une concentration d'ions cadmium de 25 μM . La taille relative des antennes collectrice de lumière augmente de 40 % par rapport au témoin entre les concentrations de 10 et 15 μM de cadmium.

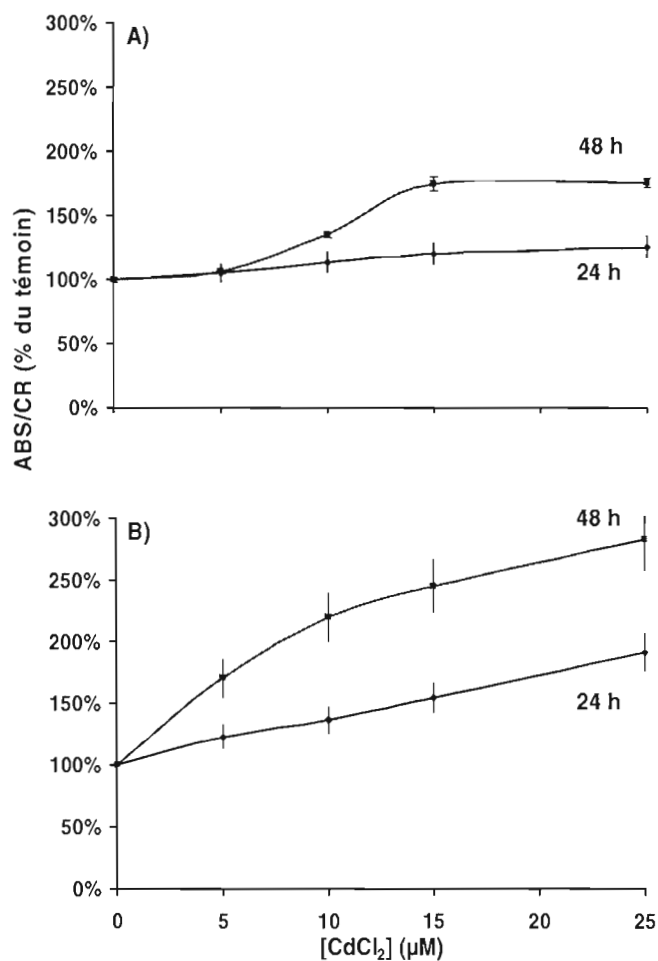


Figure 7.7 Effet du cadmium sur l'absorbance par centre réactionnel du PSII (ABS/CR) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125)(A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400)(B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).

Les changements de la taille des antennes collectrices de lumière sont plus significatifs pour la souche mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvue de paroi cellulaire (Figure 7.7B). Pour cette souche cellulaire, nous avons observé une augmentation de 91 % de la taille des antennes collectrices de lumière après 24 heures d'exposition à 25 μM d'ions cadmium. Cette augmentation atteint 183 % pour la même concentration après 48 heures.

Donc, l'augmentation de la taille relative des antennes collectrices de lumière montre que les ions cadmium inactivent les centres réactionnels P680 de l'algue unicellulaire *C. reinhardtii*. Cette augmentation s'explique du fait que les antennes collectrices de lumière associées à un centre réactionnel inactif captent la lumière et la redistribuent vers les centres réactionnels opérationnels (Strasser et Tsimilli-Michael, 1998). L'augmentation de la taille relative des antennes collectrices de lumière est plus importante en absence de la paroi cellulaire. Cette différence est due à l'inactivation d'une plus grande proportion de centres réactionnels du PSII.

Le «quenching» de fluorescence causé par le changement du «pool» de plastoquinones réduites (qPQ)

Le paramètre qPQ représente le «pool» de plastoquinones participant au transport des électrons associé aux réactions photochimiques du PSII. Pour les cellules *C. reinhardtii* de type sauvage, il y a une petite diminution des valeurs de ce paramètre après 24 et 48 heures de traitement (Figure 7.8A). Cette diminution est de 15 % après 24 heures et atteint 18 % après 48 heures d'exposition à 25 μM d'ions cadmium. Chez les cellules dépourvues de paroi cellulaire, la diminution de ce paramètre est similaire après 24 h de traitement et plus importante après 48 h par rapport à la souche de type sauvage (Figure 7.8B). Après 24 heures, l'effet est faible et le degré d'inhibition est près de 10 % en présence de 25 μM de CdCl_2 . Cependant, après 48 heures d'exposition à cette concentration, la diminution de ce paramètre atteint 30 % par rapport à la valeur du témoin. Ce paramètre est influencé par la toxicité des ions cadmium et il nous indique une baisse des plastoquinones participant au transport d'électrons en fonction de la concentration de ce métal lourd. Donc, nous avons montré que les ions cadmium ont un effet sur l'inactivation du CR du PSII, le complexe de dégagement d'oxygène et le transport des électrons.

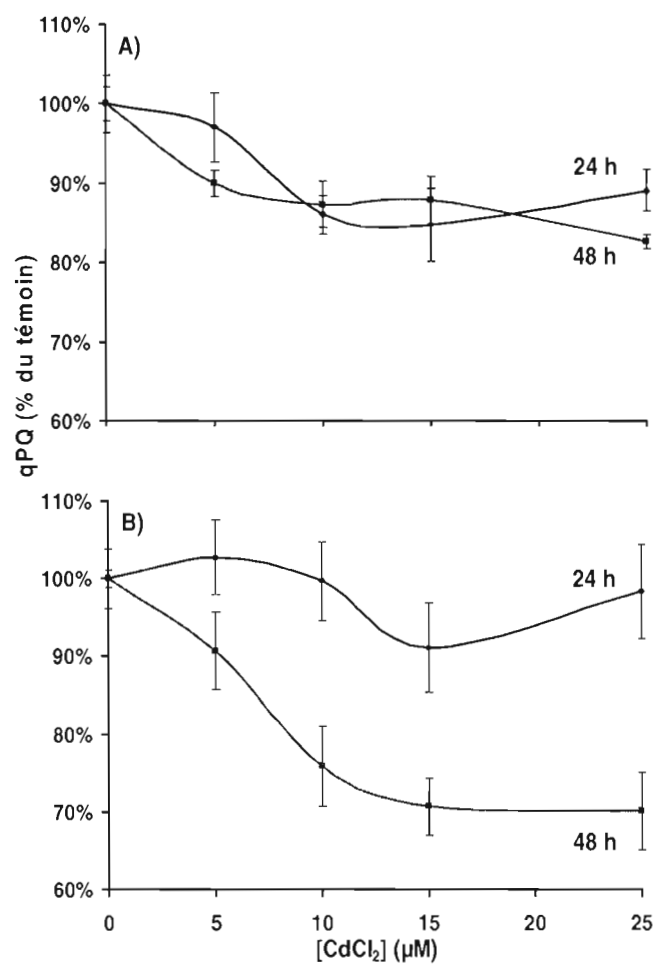


Figure 7.8 Effet du cadmium sur le «quenching» de fluorescence causé par le changement du «pool» de plastoquinones réduites (qPQ) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).

Le «quenching» de fluorescence associé au changement du gradient de protons (qE_{\max})

Le paramètre qE_{\max} reflète un gradient de protons associé aux membranes des thylacoïdes. Nous avons constaté une importante diminution de la capacité de l'algue *C. reinhardtii* à former un gradient de protons en présence d'ions cadmium. Pour la cellule de type sauvage, la diminution de qE_{\max} par rapport au témoin est de près de 40 % pour une concentration de 10 μM et elle atteint 82 % à 25 μM après seulement 24 heures de traitement (Figure 7.9A). Les changements de ce paramètre sont plus grands après 48 heures de traitement. En effet, l'inhibition atteint 85 % par rapport au témoin quand la concentration de cadmium est 10 μM . Ce changement de qE_{\max} demeure constant entre 10 et 25 μM d'ions cadmium.

Nos résultats indiquent une diminution plus rapide de qE_{\max} pour les cellules mutantes dépourvues de paroi cellulaire (Figure 7.9B). Lorsque cette souche cellulaire est mise en présence de 5 μM de cadmium pendant 24 heures, la diminution du «quenching» associée à la formation du gradient de protons est de 40 % par rapport au témoin. Cette diminution atteint 82 % pour une concentration de 25 μM d'ions cadmium, toujours après 24 heures de traitement. La diminution de ce paramètre de fluorescence chlorophyllienne est plus importante après 48 heures de traitement. En effet, 5 μM d'ions cadmium crée une diminution de qE_{\max} de 83 % par rapport au témoin. L'augmentation de la concentration de cadmium de 5 à 25 μM n'a pas d'effet sur le paramètre qE_{\max} pour cette souche cellulaire.

Tel que présenté au chapitre I (1.2.4), la formation du gradient de protons dépend d'un transport d'électrons dans le système membranaire des thylacoïdes. Ceci implique un bon fonctionnement du complexe de dégagement d'oxygène car il participe à la formation du gradient de protons par l'oxydation de l'eau. Nos résultats montrent que le changement du paramètre qE_{\max} représente un important indicateur de la toxicité du cadmium chez les algues *C. reinhardtii*.

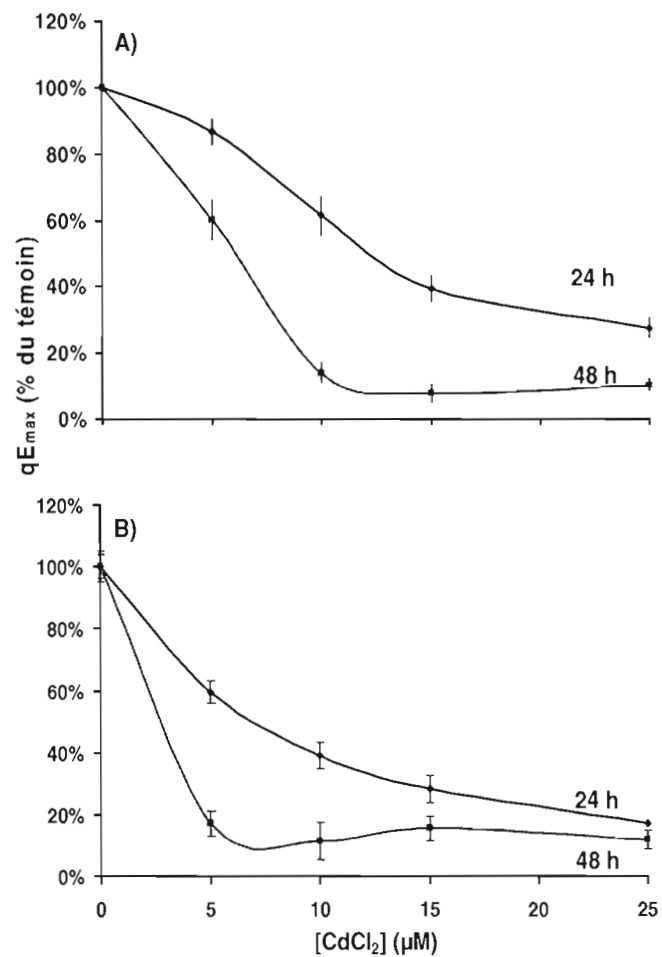


Figure 7.9 Effet du cadmium sur le «quenching» de fluorescence associé au gradient de protons (qE_{max}) chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=3).

7.2.3 Changements des cinétiques de fluorescence modulée en présence de cadmium

Le comportement photochimique des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* adaptées à la lumière et exposées aux ions cadmium est étudié en utilisant le PAM.

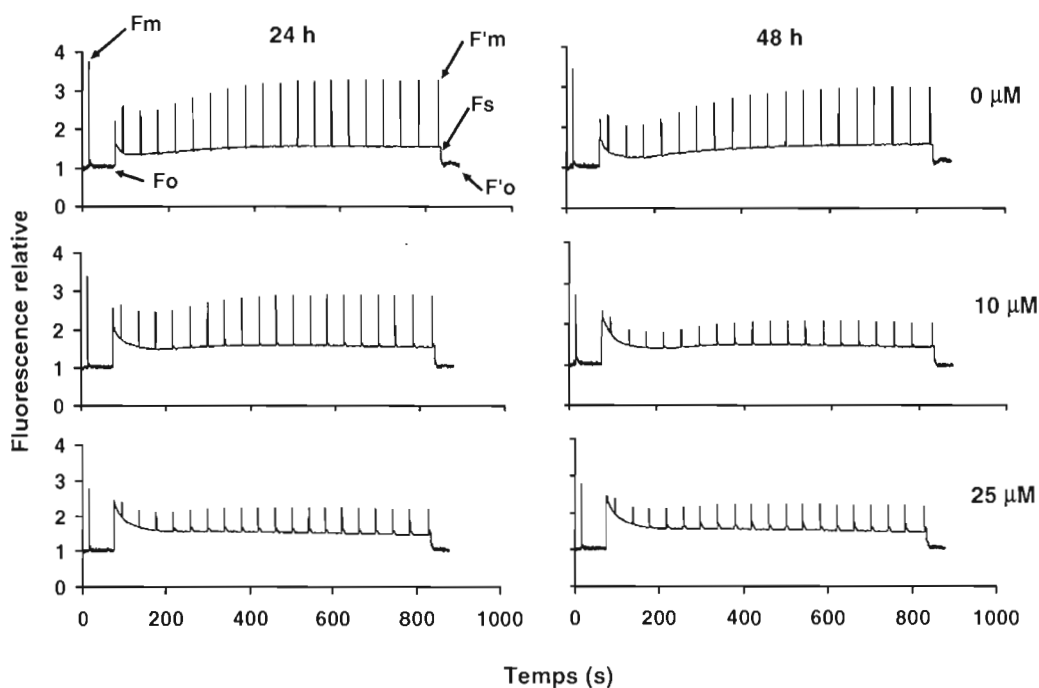


Figure 7.10 Changements dans les cinétiques de fluorescence modulée pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) exposée au chlorure de cadmium pendant 24 et 48 heures (Spectres normalisés à F_o) ($n=2$).

Les cinétiques de fluorescence modulée obtenues des algues *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage traitées au cadmium montrent un important changement (Figure 7.10). Le rendement total de fluorescence des cellules adaptées à l'obscurité (F_m) a diminué progressivement quand la concentration de cadmium a augmentée. Cette diminution est un peu plus évidente lorsque les cellules ont été exposées au cadmium pendant 48 heures par rapport aux rendements de fluorescence obtenus après 24 heures. Le rendement de fluorescence total à l'état stationnaire lorsque les cellules sont adaptées à la lumière (lumière actinique) a aussi diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration de cadmium. La diminution du rendement de fluorescence obtenu par l'éclair saturant (F'_m) a diminué ce qui indique l'inhibition du transport d'électron associé au PSII. Le haut niveau

de fluorescence à l'état stationnaire (F_s) (fluorescence obtenue par la lumière actinique) chez les cellules exposées aux effets du cadmium peut indiquer une fermeture des centres réactionnels du PSII. Ceux-ci ne participent pas au transport linéaire d'électrons vers le PSI.

Les changements des rendements de fluorescence F_m , F'_m , et F_s ont été plus prononcés chez les algues sans paroi cellulaire quand elles ont été exposées aux effets toxiques du cadmium (Figure 7.11). Nous avons démontré que le PSII chez les algues sans paroi cellulaire a été plus rapidement inhibé par les effets du cadmium comparé aux cellules de type sauvage.

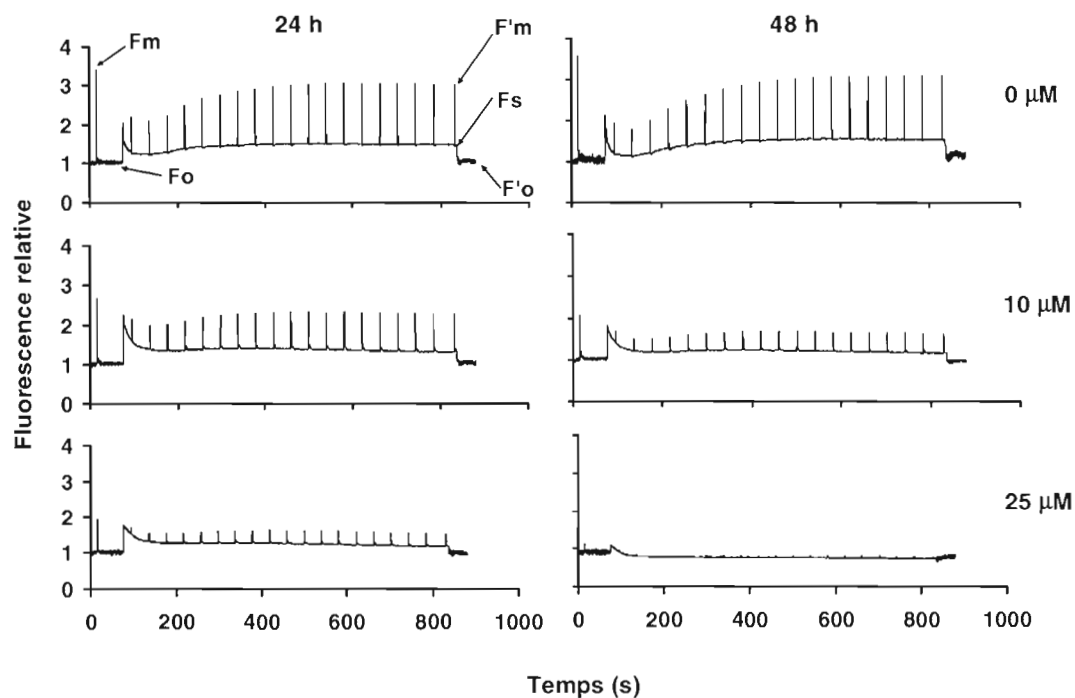


Figure 7.11 Changements dans les cinétiques de fluorescence modulée pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) exposée au chlorure de cadmium pendant 24 et 48 heures (Spectres normalisés à F_o)($n=2$).

7.2.4 Les paramètres de fluorescence chlorophyllienne comme indicateur d'effets toxiques du cadmium sur la photochimie du PSII

Dans notre étude, nous avons utilisé trois paramètres de la cinétique de fluorescence modulée: l'efficacité photochimique du PSII (ϕ_M), l'efficacité photochimique opérationnelle du PSII (ϕ'_M) et le «quenching» photochimique (q_P). Les changements de ces paramètres ont aussi été évalués pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* mutante sans paroi cellulaire afin de poursuivre notre étude de l'effet de la paroi cellulaire sur la toxicité du cadmium.

Le rendement photochimique du PSII

Le paramètre ϕ_M représente le rendement photochimique maximal du PSII lorsque l'échantillon est adapté à l'obscurité. Les rendements photochimiques, mesurés par deux méthodes fluorimétriques différentes ont montré des résultats semblables quant à la toxicité du cadmium (Figure 7.6 et 7.12). Ainsi, l'interprétation de ces résultats est la même.

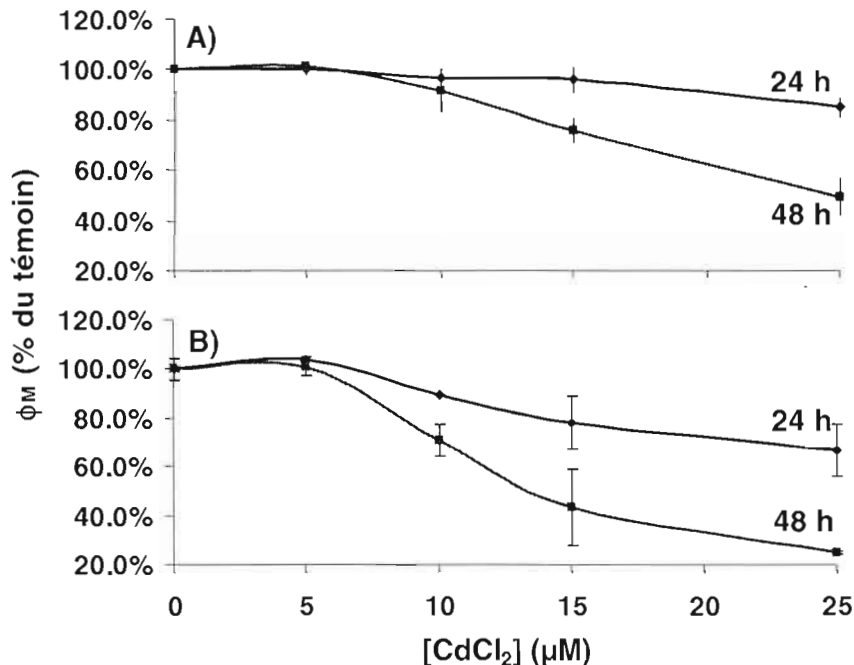


Figure 7.12 Effet du cadmium sur le rendement photochimique maximal du PSII (ϕ_M) pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=2).

Le rendement photochimique opérationnel du PSII (ϕ'_M)

Le rendement photochimique opérationnel maximal représente la capacité de l'appareil photosynthétique du PSII à convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique lorsqu'il est adapté à la lumière. Ce paramètre diminue après 24 heures d'exposition au cadmium pour les cellules de type sauvage (Figure 7.13A). En effet, la diminution de ϕ'_M est de 25 % pour une concentration de cadmium de 25 μM . Nos résultats montrent une diminution plus importante de ϕ'_M lorsque les cellules sont exposées pour une période de 48 heures. Ainsi, la valeur de ϕ'_M diminue de 63 % par rapport au témoin lorsque les cellules sont en présence de 25 μM d'ions cadmium.

La diminution des valeurs de ce paramètre est plus rapide pour les algues dépourvues de paroi cellulaire (Figure 7.13B). En effet, après 24 heures de traitement à 25 μM de cadmium, la baisse de ϕ'_M est de 48 % par rapport au témoin. Pour la même concentration, après 48 heures de traitement, la diminution atteint 76 % de la valeur du témoin.

Donc, les ions du cadmium diminuent le rendement de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cet effet est plus important pour les cellules dépourvues de paroi cellulaire. Ces résultats indiquent que le cadmium affecte la chaîne de transporteurs d'électrons associés aux membranes des thylacoïdes.

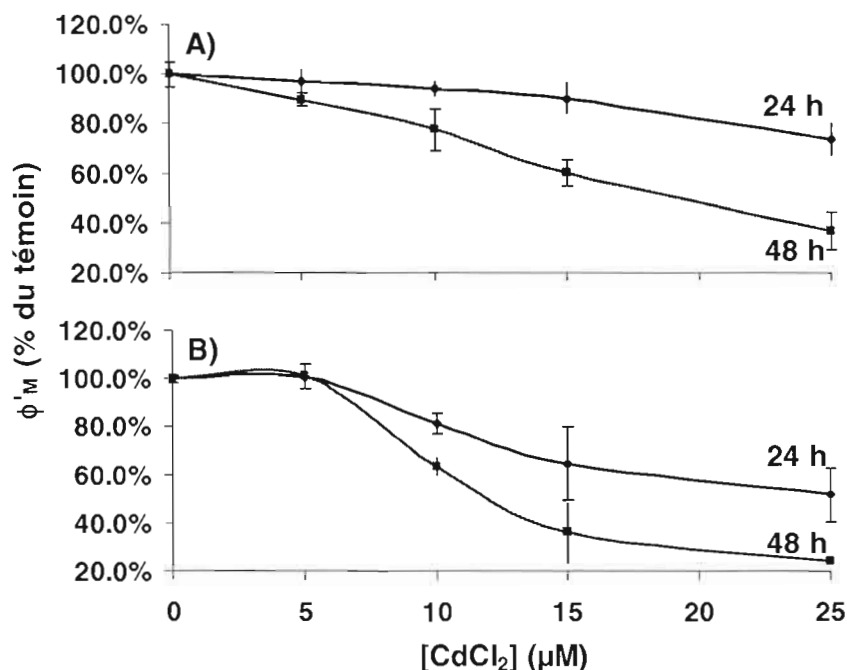


Figure 7.13 Effet du cadmium sur le rendement photochimique opérationnel maximal du PSII (ϕ'_M) pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition (n=2).

Le «quenching» photochimique

Le paramètre q_p représente la proportion de l'énergie d'excitation utilisée pour le transport d'électrons par les CR du PSII ouverts. Ainsi, bien que le nombre de centres réactionnels fonctionnels diminue, nous sommes en mesure d'évaluer le fonctionnement des centres réactionnels toujours actifs. Les résultats de notre étude montrent une diminution des valeurs de q_p en fonction du degré de toxicité induit chez les cellules de *C. reinhardtii*. D'abord, la diminution de q_p est faible pour les cellules de type sauvage après 24 heures de traitement (Figure 7.14A). Ainsi, une concentration de 25 μM de cadmium crée une diminution de seulement 15 % par rapport au témoin. L'effet toxique des ions de cadmium est un peu plus élevé après 48 h alors que la diminution de q_p est de 24 % en présence de 25 μM de cadmium. De plus, les résultats obtenus indiquent que les valeurs de ce paramètre de fluorescence demeurent stables entre 5 et 25 μM de cadmium après 48 heures de traitement.

La diminution de q_p est semblable pour les cellules sans paroi, tant après 24 que 48 heures de traitement (Figure 7.14B). Les effets toxiques du cadmium créent une diminution graduelle de q_p après 24 heures. Cette baisse atteint 15 % par rapport au témoin en présence de 25 μM de ce métal lourd. Aussi, un temps d'exposition de 48 heures à cette concentration de cadmium induit une diminution de 34 % de la valeur de q_p par rapport au témoin. Donc, la toxicité des ions cadmium diminue la proportion de photons absorbés par les CR du PSII ouverts qui sont utilisés pour les réactions photochimiques.

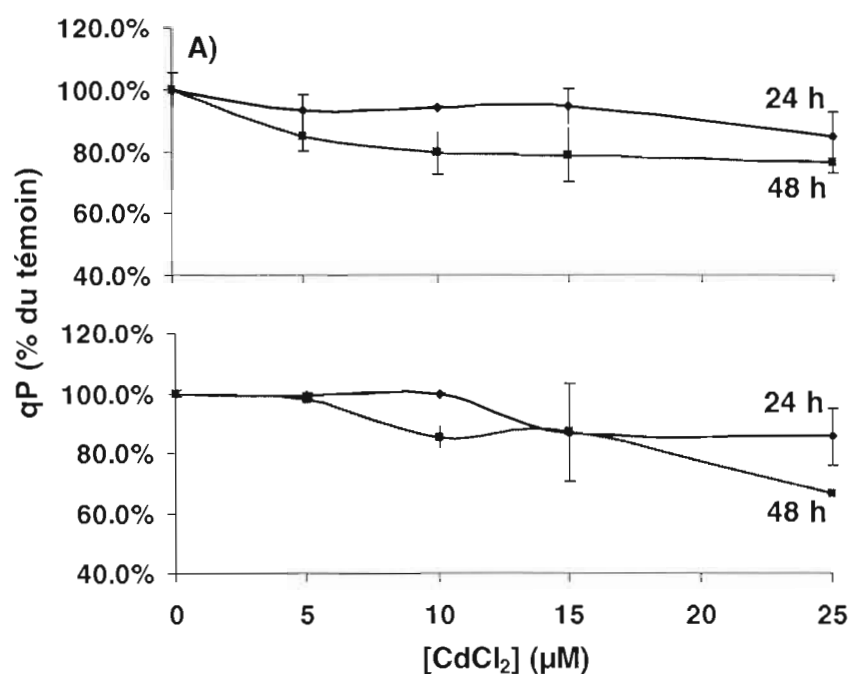


Figure 7.14 Effet du cadmium sur le «quenching» photochimique (q_p) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition ($n=2$).

Le «quenching» non photochimique (q_N)

Le «quenching» non photochimique (q_N) est un paramètre estimant la dissipation d'énergie du PSII sous forme non photochimique. Les résultats de notre étude montrent une augmentation importante de la valeur de ce paramètre photosynthétique (Figure 7.15). En

effet, après seulement 24 heures en présence de 25 μM d'ions cadmium, la valeur de q_N augmente de 126 % pour la souche de *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage. Après, 48 heures, cette augmentation est de 387 %. Ces variations à la hausse sont également observées chez la souche mutante dépourvue de paroi cellulaire. En effet, la valeur de q_P augmente de 268 % par rapport au témoin après 24 heures de traitement à 25 μM d'ions cadmium. Après 48 h dans les mêmes conditions, cette augmentation passe à 380 % par rapport au témoin. Donc, la présence des ions cadmium favorise la dissipation d'énergie sous forme non radiative.

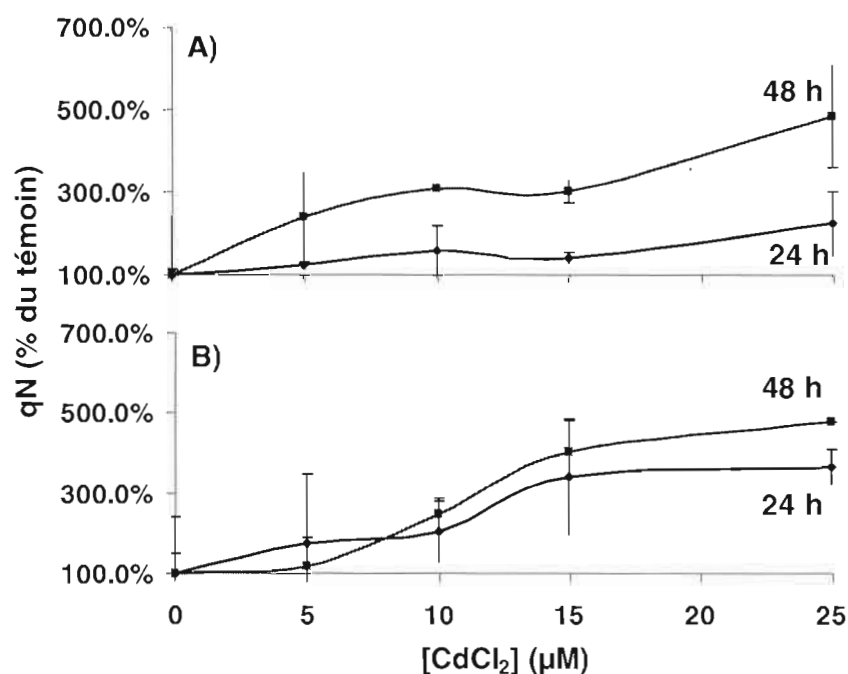


Figure 7.15 Effet du cadmium sur le «quenching» non-photochimique (q_N) de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition ($n=2$).

7.2.5 Discussion sur les effets des ions cadmium sur les cinétiques de fluorescence chlorophyllienne

Les cinétiques de fluorescence rapides et polyphasiques

Les cinétiques de fluorescence rapide et polyphasiques indiquent un effet des ions cadmium sur le complexe de dégagement d'oxygène. En effet, l'inhibition du côté donneur du PSII mène fréquemment à une baisse de F_m durant l'induction de la fluorescence en raison du manque d'électrons disponibles pour l'accumulation de Q_A photoréduite (Govindjee, 1995). Puisque le complexe de dégagement d'oxygène est inhibé, il ne peut pas réduire le centre réactionnel P680 qui a perdu un électron lors de la séparation de charges (photochimie primaire). En conséquence, les centres réactionnels deviennent inactivés et le transport d'électrons est diminué. L'ensemble des changements des paramètres d'analyse de la cinétique rapide et polyphasique (ϕ PSII, qE_{max} et ABS/CR) confirment cet effet toxique des ions cadmium. En effet, l'inactivation des centres réactionnels du PSII implique une diminution du rendement photochimique. Les centres réactionnels ne sont pas en mesure d'offrir un transport d'électrons adéquat en présence de lumière. La diminution du transport d'électrons et l'inhibition du complexe de dégagement d'oxygène fait diminuer de façon importante le gradient de protons de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes. Finalement, l'inactivation des centres réactionnels fait en sorte que la taille relative des antennes collectrices de lumière augmente. Cette augmentation est en lien direct avec l'augmentation de F_o et la baisse de F_v . La fluorescence F_o provient des molécules de Chl a associées aux antennes collectrices de lumière et il a été montré que le transfert d'énergie de ce complexe vers le centre réactionnel P680 est altéré sous l'action de Cd, Cu, Ni et Cr (Mallich et Mohn, 2003, Ilangovan *et al.*, 1998). Ainsi, Mallich et Mohn (2003) proposent le ratio F_o/F_v comme un indicateur important dans la recherche lors de stress aux ions métalliques. Selon eux, l'augmentation de ce ratio suggère que les métaux en général ont un impact sur le complexe de dégagement d'oxygène. Le complexe de dégagement d'oxygène serait la cible principale des métaux lourds. Donc, nous avons évalué les changements du ratio F_o/F_v sur les algues *C. reinhardtii* en présence de cadmium. Les variations de ce ratio sont importantes pour les deux souches d'algues *C. reinhardtii* (Figure 7.16). Ces résultats viennent confirmer l'action des ions cadmium sur le complexe de dégagement d'oxygène.

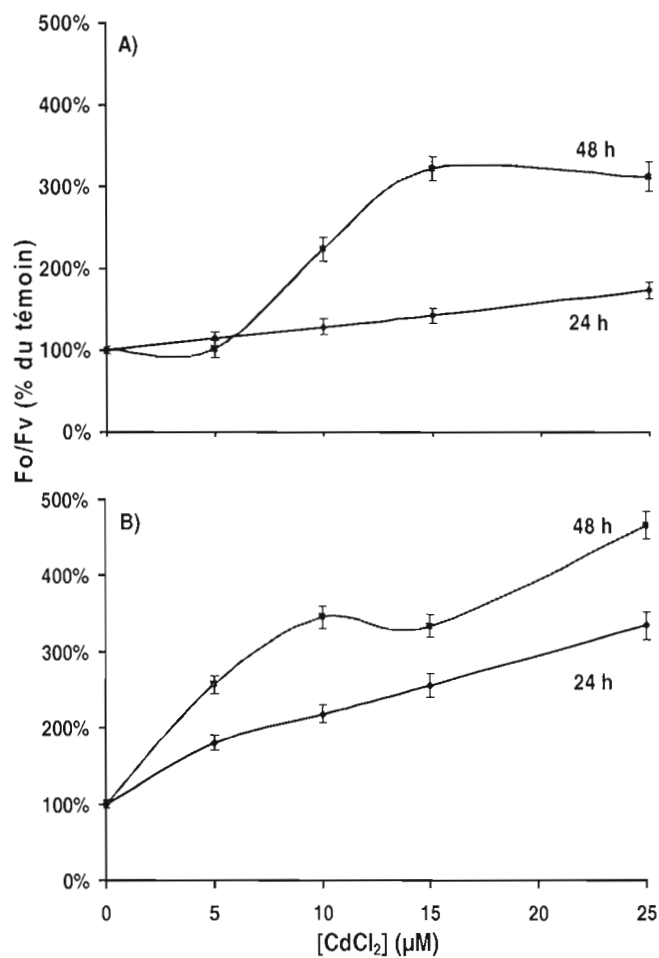


Figure 7.16 Effet du cadmium sur le ratio F_o/F_v chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* de type sauvage (CC-125) (A) et mutante dépourvue de paroi cellulaire (CC-400) (B) après 24 et 48 heures d'exposition ($n=3$).

Donc, dans notre étude, les biomarqueurs photosynthétiques les plus sensibles après 48 heures de traitement aux effets du cadmium sur l'algue *C. reinhardtii* sans paroi cellulaire sont qE_{max} et F_o/F_v . Ces biomarqueurs ont une EC_{50} de 2,5 et 2 μM respectivement.

Plusieurs études ont rapporté des résultats semblables à ceux de notre étude en utilisant diverses espèces végétales et différents métaux lourds. Une diminution du rendement photochimique a été observée chez *Dunaliella tertiolecta* en présence de mercure (Samson et Popovic, 1990). Pour *H. Ovalis* traité 72 heures en présence de 5-10 mg/L de cadmium, le rendement photochimique a diminué de 40 % (Ralph et Burchett, 1998). De plus, une exposition de 5 h en présence de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (II) a fait diminuer ϕ_M de 25 % chez *S. capricornutum* (Juneau et Popovic, 1999). Pour Geoffroy et al. (2003), les paramètres ABS/CR et qE_{max} furent les biomarqueurs photosynthétiques les plus sensibles aux effets toxiques du cuivre chez l'algue *S. obliquus*. Il semble être évident que le cuivre affecte le transport d'électrons du côté oxydant et également du côté réducteur du PSII (Jegerschöld et al., 1995; Horvath et al., 1998; Yruela et al., 2000).

Les cinétiques de fluorescence modulée

Les paramètres de fluorescence des cinétiques modulées indiquent une diminution du rendement photochimique du PSII (ϕ_M), du rendement photochimique opérationnel du PSII (ϕ'_M) et du «quenching» photochimique (q_P) ainsi qu'une augmentation du «quenching» non photochimique (q_N). Ces paramètres montrent une sensibilité légèrement différente pour les mêmes concentrations et durées d'exposition aux ions du cadmium. Dans notre étude, seul le paramètre q_P ne présente pas une valeur de EC_{50} qui se situe à l'intérieur des concentrations de cadmium à l'étude. Cependant, le paramètre q_N semble être le plus sensible. En effet, notre étude montre une EC_{50} inférieure à 5 μM (0,9 mg/L) après 48 h de traitement aux ions du cadmium. Un autre paramètre sensible est ϕ'_M qui montre une valeur de EC_{50} entre 15 et 20 μM suite à un traitement des algues de 48 heures. Les changements de ϕ'_M ont montré que le cuivre affecte la chaîne de transport d'électrons en entier (Juneau et al., 2002). Donc, il semble que le cadmium affecte l'appareil photosynthétique du côté oxydant et réducteur du PSII,

Les paramètres de fluorescence modulée ont été utilisés dans plusieurs études comme indicateurs de toxicité des métaux lourds. Ainsi, pour *Chlorella vulgaris*, des concentrations de 1 et 2 mg L^{-1} de cadmium n'ont eu qu'une très faible diminution de q_P (Illangovan et al.,

1998). Une autre étude, utilisant *Scenedesmus obliquus* a indiqué une diminution de q_p de 15 % en présence de 25 μM de cadmium (Mallick et Mohn, 2003). Dans cette étude, c'est le cadmium qui montrait la plus forte baisse de q_p à cette concentration de métaux lourds ($\text{Cd} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Cu} > \text{Zn}$). Pour leur part, Juneau et *al.* (2002) ont obtenu des résultats plus sensibles pour les paramètres ϕ'_M et q_p en utilisant *Chlamydomonas reinhardtii* pour évaluer la toxicité du cuivre. En effet, la EC_{50} après 48 heures était de 13 et 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ pour les paramètres ϕ'_M et q_p respectivement. Il est possible que le milieu de culture et le cycle circadien utilisé ait un effet sur la toxicité du cuivre.

Les paramètres ϕ'_M et q_N sont souvent des indicateurs plus sensibles que q_p lorsque des espèces végétales sont étudiées en présence de métaux lourds et d'herbicides (Juneau et *al.*, 2005). Notre étude en est un autre exemple. Donc, q_N et q_p sont des paramètres non complémentaires. Afin d'y remédier, Buschmann (1995) et Juneau et *al.* (2005) ont proposé trois nouveaux paramètres, soit le «quenching» photochimique relatif ($q_{p(\text{rel})}$), le «quenching» non photochimique relatif ($q_{N(\text{rel})}$) et le «relative unquenched fluorescence» ($\text{UQF}_{(\text{rel})}$). Ces paramètres se calculent comme suit :

$$q_{p(\text{rel})} : (F'_M - F_s) / (F_M - F'_o) \quad (\text{Buschmann, 1995})$$

$$q_{N(\text{rel})} : (F_M - F'_M) / (F_M - F'_o) \quad (\text{Buschmann, 1995})$$

$$\text{UQF}_{(\text{rel})} : (F_s - F'_o) / (F_M - F'_o) \quad (\text{Juneau et } al., 2005)$$

Ces trois paramètres sont complémentaires, ils utilisent le même dénominateur et la somme des trois devrait être égale à un. Ainsi, ils facilitent l'étude sur les différentes voies de dissipation de l'énergie. Afin de bien comprendre les voies de dissipations d'énergie en présence des ions métalliques du cadmium, les valeurs de ces nouveaux paramètres sont présentées dans le tableau 7.1.

Tableau 7.1 Comparaison de valeurs des paramètres q_P , q_N et $1-q_P$ avec les paramètres relatifs $q_{P(rel)}$, $q_{N(rel)}$ et $UQF_{(rel)}$ ($n=2$).

CC-125								
	[CdCl ₂] (μM)	q_P	$q_{P(rel)}$		q_N	$q_{N(rel)}$		$1-q_P$ $UQF_{(rel)}$
24 heures	0	0.783	0.689		0.120	0.119		0.218 0.192
	5	0.730	0.622		0.148	0.148		0.270 0.230
	10	0.738	0.597		0.191	0.191		0.263 0.212
	15	0.741	0.615		0.171	0.170		0.259 0.215
	25	0.666	0.489		0.270	0.270		0.335 0.241
48 heures	0	0.744	0.791		0.111	0.111		0.257 0.273
	5	0.633	0.466		0.266	0.266		0.368 0.268
	10	0.592	0.387		0.346	0.346		0.409 0.267
	15	0.588	0.389		0.336	0.336		0.413 0.275
	25	0.567	0.259		0.540	0.540		0.433 0.201

CC-400								
		q_P	$q_{P(rel)}$		q_N	$q_{N(rel)}$		$1-q_P$ $UQF_{(rel)}$
24 heures	0	0.761	0.683		0.109	0.102		0.240 0.214
	5	0.754	0.612		0.190	0.190		0.246 0.199
	10	0.761	0.591		0.223	0.223		0.240 0.186
	15	0.661	0.425		0.372	0.372		0.339 0.203
	25	0.651	0.393		0.399	0.399		0.349 0.208
48 heures	0	0.757	0.647		0.146	0.146		0.244 0.208
	5	0.740	0.611		0.175	0.175		0.260 0.214
	10	0.646	0.409		0.365	0.365		0.354 0.226
	15	0.661	0.271		0.588	0.587		0.340 0.141
	25	0.503	0.151		0.700	0.700		0.497 0.149

Il est possible d'observer que les valeurs des paramètres relatifs varient différemment. En effet, les valeurs de $q_{P(rel)}$ diminuent plus rapidement que celles de q_P . De plus, $q_{N(rel)}$ et q_N sont identiques après 24 et 48 h pour les deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii*. Enfin, $1-q_P$ augmente tandis que le paramètre $UQF_{(rel)}$ demeure relativement stable après 24 et 48 h de traitement. Donc, en utilisant ce calcul, il semble qu'il y ait moins d'énergie lumineuse qui soit utilisée pour les réactions photochimiques lorsque le temps d'exposition et les concentrations d'ions cadmiums augmentent. Suite à l'augmentation importante des valeurs de $q_{N(rel)}$, il est possible de dire qu'en présence d'ions cadmium, une grande partie de l'énergie qui n'est plus utilisée pour les réactions photochimiques est dissipée sous forme non radiative puisque $UQF_{(rel)}$ varie très peu (Juneau et al., 2005).

Effet de la paroi cellulaire sur la toxicité des ions du cadmium

La souche de *Chlamydomonas reinhardtii* sans paroi cellulaire a été un meilleur bioindicateur que la souche de type sauvage. Tous les paramètres de fluorescence chlorophyllienne ont montré un effet plus important de la toxicité des ions cadmium pour les cellules sans paroi cellulaire. Cette différence s'explique par la moins grande capacité de la cellule sans paroi pour adsorber les ions métalliques à la surface cellulaire (Kola et *al.*, 2004; Macfie et Welbourn, 2000). La paroi cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* montre une grande affinité pour les cations métalliques (Collard et Matagne, 1990) et représente la première barrière protectrice contre les métaux lourds (Hanikenne, 2003). Une hypothèse possible est que la concentration intracellulaire d'ions métalliques est plus importante chez les cellules sans paroi en raison de la moindre capacité d'adsorption à la surface cellulaire. Une plus grande concentration de cadmium au niveau intracellulaire implique des dommages plus importants (Hanikenne, 2003). Il y a donc un plus grand taux de complexations avec différentes biomolécules et un dommage oxydatif plus important. Ces effets des métaux lourds ont des conséquences sur l'activité photosynthétique des plantes, ce qui explique les résultats obtenus dans cette étude.

Relation entre les résultats de cytométrie et de fluorescence

Dans notre étude, il y a corrélation entre les résultats obtenus en cytométrie de flux et ceux de la fluorescence chlorophyllienne. En effet, tel que discuté précédemment, il est probable que l'induction des groupements thiols intracellulaires soient lié à la présence d'ERO. De plus, il est probable que le stress oxydatif induit par les ions cadmium soit en lien avec la baisse du niveau de fluorescence chlorophyllienne (Stoeva et Bineva, 2003). Ceci serait dû aux modifications structurales des protéines importantes de l'appareil photosynthétique. Ces modifications pourraient être causées par la liaison des ions cadmium ou des ERO sur les groupements fonctionnels des protéines.

Mécanismes d'action impliqués dans la toxicité des ions du cadmium

Les ions cadmium produisent des dommages de façon non spécifique, en produisant des ERO. D'autres dommages sont plus spécifiques alors que les ions de cadmium prennent la place de d'autres cations et interagissent avec les biomolécules. Ainsi, Faller et *al.* (2005) mentionnent que les ions de cadmium pourraient prendre la place de l'ion calcique au niveau du site catalytique du complexe de dégagement d'oxygène provoquant ainsi l'inhibition de la dernière étape lors de l'assemblage du PSII à son état fonctionnel, la photoactivation. Lors de la photoactivation, les ions Mn^{2+} , Ca^{2+} et Cl^- , ainsi que la lumière sont requis comme cofacteurs. Suite à l'exposition à la lumière, le photosystème est activé et peut produire de l'oxygène (Ananyev et *al.*, 2001; Ferreira et *al.*, 2004). Les trois ions métalliques Hg (II), Cu (II) et Pb (II) ont déjà montré qu'ils affectent le complexe de dégagement d'oxygène en causant la relâche de polypeptides extrinsèques associés à la stabilisation du «cluster» de manganèse impliqué dans l'oxydation de l'eau (Rashid et Popovic, 1990; Bernier et *al.*, 1993; Rashid et *al.*, 1994; Bernier et Carpentier, 1995). De plus, chez une espèce intoxiquée par les métaux lourds, il est possible que les ions métalliques prennent la place de l'ion Mg^{2+} dans la molécule de chlorophylle. Des études ont publié des spectres démontrant la formation de ces nouveaux complexes (ML-Chl) (Küpper et *al.*, 1998). La plupart de ces études se réfèrent aux lichens et aux algues microscopiques. Plus récemment, il a été montré qu'une telle substitution de l'ion Mg^{2+} au niveau du centre réactionnel du PSII est en accord avec la diminution du rendement photochimique (Kupper et *al.*, 1998).

D'un autre côté, les ions de cadmium pourraient induire de façon indirecte la libération des peptides formant le complexe de dégagement d'oxygène, soit via les espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, les métaux lourds induisent des ERO qui sont dommageable pour les peptides du complexe de dégagement d'oxygène. Une fois endommagé, il a été montré que la sous-unité OEC33 ne peut pas se lier au PSII et il y a inhibition du complexe (Henmi et *al.*, 2004). D'un autre côté, les dommages ne se limitent pas seulement du côté donneur. En effet, les ERO générées en présence d'ions métalliques du cadmium affectent différentes biomolécules cellulaires. Les ERO peuvent oxyder des molécules dans le chloroplaste, dont les photosystèmes et également les enzymes contenant des groupements thiols dans le cycle de Calvin-Benson (Kaiser, 1979; Tanaka et *al.*, 1982). En effet, il a été montré récemment

que les ERO menaient à la photoinhibition en inhibant la synthèse de *novo* de la sous-unité D1 qui est essentielle pour contrer cette photoinhibition (Nishiyama et *al.*, 2001). Or, par ces publications, nous pouvons interpréter que le cadmium peut inhiber l'activité photosynthétique de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* via la génération d'ERO.

Bien qu'il ait été mentionné récemment qu'il n'est pas clair si la diminution du transport d'électrons était due à un effet des ions cadmium du côté donneur ou accepteur du PSII (Novacova et *al.*, 2004) nos résultats indiquent que l'effet dominant est du côté donneur en inhibant le complexe de dégagement d'oxygène.

7.3 Effets du cadmium sur la biosynthèse de la chlorophylle et la formation de photosystèmes

7.3.1 Effet du cadmium sur l'activité enzymatique de POR

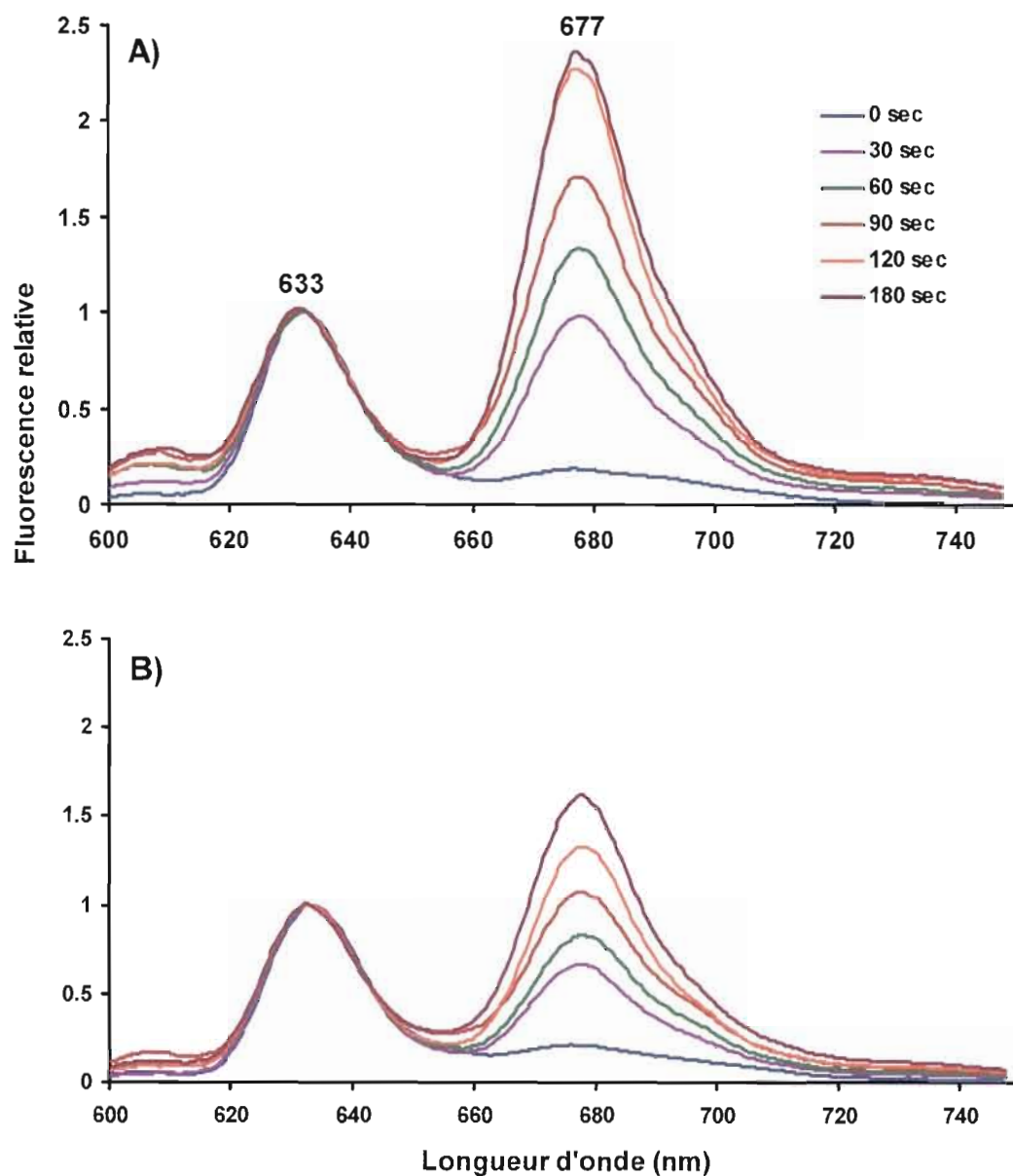


Figure 7.17 Photoconversion de la PChlide en Chlide chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1168 y-1) en présence de (A) 0 et (B) 100 μM d'ions cadmium suite à l'exposition à une lumière de 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (normalisé à 633 nm)(n=1).

La figure 7.17 montre que le processus de photoconversion de la PChlide en Chlide est moins efficace lorsque les cellules ont préalablement été traitées pendant 6 h à une concentration de 100 μM d'ions cadmium. Cette photoconversion est le résultat de l'activité enzymatique de la protéine POR. Afin de bien visualiser ce retard, les spectres de fluorescence ont été normalisés à 633 nm, longueur d'onde correspondant à la fluorescence maximale du pigment PChlide photoactif (PChlideF633) chez l'algue *C. reinhardtii* (CC-1168 y1).

Il y a une très faible différence du ratio de la fluorescence de Chlide/PChlide pour les cellules traitées au cadmium avant l'exposition à la lumière (0 s) (Tableau 7.2). Toujours selon ce ratio, le retard de l'activité enzymatique de POR après seulement 30 secondes de photoconversion est important pour l'échantillon mis en présence d'ions métalliques de cadmium. Cette différence dans cette étape limitante de la biosynthèse de la chlorophylle augmente durant les trois minutes d'exposition à la lumière. Finalement, il y a un faible décalage vers de plus courtes longueurs d'onde du maxima de la bande associée à la Chlide des échantillons cellulaires de *Chlamydomonas reinhardtii* traités aux ions cadmium (Tableau 7.3).

Tableau 7.2 Changements de l'activité enzymatique de POR pour les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* exposées au cadmium (exprimé selon la fluorescence de Chlide-F677/PChlide-F633).

Temps d'exposition à la lumière (s)	Ratio Chlide/Pchlide	
	Concentrations de CdCl_2 (μM)	
	0	100
0	0.19	0.21
30	0.98	0.66
60	1.33	0.82
90	1.70	1.07
120	2.28	1.33
180	2.36	1.61

Tableau 7.3 Variation du maxima de la Chlide-F678 suite à la photoconversion de PChlide en présence d'ions cadmium.

Temps d'exposition à la lumière (s)	Maxima de Chlide (nm)	
	Concentrations de CdCl ₂ (μM)	
	0	100
30	677,5	677,5
60	678,0	677,5
90	678,0	677,5
120	678,0	677,5
180	678,0	677,5

7.3.2 Discussion sur les résultats de la photoconversion de PChlide en Chlide

Notre étude montre une augmentation du ratio de fluorescence F677/F633 pour l'échantillon traité au cadmium avant l'illumination. Cette légère augmentation nous indique une diminution de la PChlide photoactive (F633) dans l'échantillon traité au cadmium. En effet, l'augmentation de Chlide dans les échantillons qui n'ont pas été exposés à la lumière est improbable. Il est important de mentionner que seul le traitement à 100 μM de chlorure de cadmium différencie l'échantillon traité et le témoin. Or, aucune différence n'a été montrée dans les spectres de fluorescence à 77 K des échantillons d'orges exposés à 1 mM d'ions de cuivre (II) pendant 12 heures (Caspi et *al.*, 1999). Ces études arrivent à la conclusion que le cuivre (II) n'interfère pas directement dans l'accumulation du pigment PChlide photoactif. Cependant, une diminution de PChlide photoactive a récemment été rapportée chez *Triticum aestivum* en utilisant de plus fortes concentrations (10^{-3} M) de métaux lourds (Cd, Fe, Cr) et des temps d'incubation plus longs (4 à 32 h) (Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2005). Dans cette étude, il a été montré que la diminution du niveau de fluorescence attribuée à la PChlide photoactive était liée à l'augmentation de la fluorescence de la forme inactive de ce pigment. Ils ont noté que cet effet était plus important pour les ions Cd (II) que pour le Fe (III) et le Cr (VI). Ainsi, il est possible que les ions cadmium affectent la stabilité de la forme spectrale PChlide photoactive et de son complexe ternaire (PChlide :POR :NADPH) chez *C. reinhardtii*.

Le second effet des ions cadmium que nous avons observé est la diminution du taux de photoconversion de PChlide en Chlide. Il y a donc un ralentissement de la photoconversion associée à l'activité enzymatique de POR. Cet effet a été rapporté par des études utilisant des plantes supérieures et divers métaux lourds (Cd, Cr, Cu, Fe) à fortes concentrations (10^{-3} M) (Boddi et *al.*, 1995; Caspi et *al.*, 1999; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2005). Il a été montré que les métaux lourds peuvent interagir avec l'enzyme POR et ralentir la biosynthèse chlorophyllienne au niveau de la photoréduction de PChlide en Chlide. À notre connaissance, les mécanismes d'action des métaux lourds sur les étapes particulières de la synthèse chlorophyllienne n'ont pas encore été confirmés. Cependant, Mysliwa-Kurdziel et Strzalka (2005) font un lien direct entre la diminution du niveau de fluorescence associée à la PChlide photoactive et le retard dans la photoconversion de PChlide en Chlide chez *Triticum aestivum*. Dans notre étude, la diminution de la quantité de PChlide photoactive (F633) avant l'illumination est faible par rapport à l'effet sur la photoconversion de ce pigment en Chlide (Tableau 3.1). Cette observation suggère un effet plus direct du cadmium sur l'activité enzymatique de POR. L'hypothèse la plus répandue est que les ions métalliques, qui possèdent de l'affinité pour des groupements des acides aminés des protéines (SH, COO⁻), affectent le site actif de POR (Lebedev et Timko, 1998; Prasad, 1998; Berska et *al.*, 2001; Shora, 2003; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2005). Il est également possible que d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle soient affectées de la même façon par les métaux lourds. Ainsi, il a été rapporté que l'activité de la protéine déhydrogénase de acide δ -aminolevulinique, enzyme responsable de la synthèse d'un précurseur de PChlide, soit aussi affectée par les métaux lourds (Stobart et *al.*, 1985; Oliveira et *al.*, 1994; Ouzounidou, 1995; Prasad, 1998). Une diminution de l'activité de cette enzyme pourrait également expliquer la diminution de PChlide photoactif observée dans les échantillons traités au cadmium.

Finalement, le H₂O₂ induit également une diminution de la synthèse de chlorophylle (Lin et Kao, 1998, Chen et Kao, 1999). Donc, il est possible que le ralentissement dans la biosynthèse de la chlorophylle en présence de cadmium soit l'effet des espèces réactives de l'oxygène. Il a été montré que l'augmentation de la concentration de NADPH dans le milieu d'incubation en présence des ions métalliques a pour effet de diminuer les effets des ions métalliques sur l'activité enzymatique de POR (Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2005). Les

auteurs associent cet effet au rôle structurel de la molécule de NADPH dans la stabilisation du complexe ternaire PChlide : POR : NADPH (Ryberg et Sunquist, 1988). Cependant, le NADPH constitue un pouvoir réducteur cellulaire important et il est utilisé par plusieurs enzymes pour combattre le stress oxydatif (Figure 4.2). Selon nous, l'effet préventif du NADPH sur l'activité de POR peut être attribué à son rôle de stabilisation du complexe ternaire (PChlide : POR : NADPH) ainsi qu'à son rôle pour contrer le stress oxydatif. Nous pensons que le cadmium affecte l'activité de POR en se liant au groupement thiols du site actif de l'enzyme POR.

7.3.3 Effet du cadmium sur la formation des photosystèmes

La formation des photosystèmes et des complexes pigments-protéines qui y sont associés (LHCII et LHCI) sont visibles par les spectres de fluorescence à 77 K. La formation du PSII est caractérisée par le déplacement de la bande de la chlorophylle (F685) vers de plus grandes longueurs d'onde (F695). La formation du PSI est indiquée par la formation d'une bande à environ 710 nm. Les résultats présentés à la figure 7.18 montrent le retard dans la formation de photosystèmes lorsque les cellules ont été traitées pendant six heures à une concentration de 100 μM d'ions cadmium. La formation des photosystèmes fait suite à l'étape de biosynthèse de la chlorophylle.

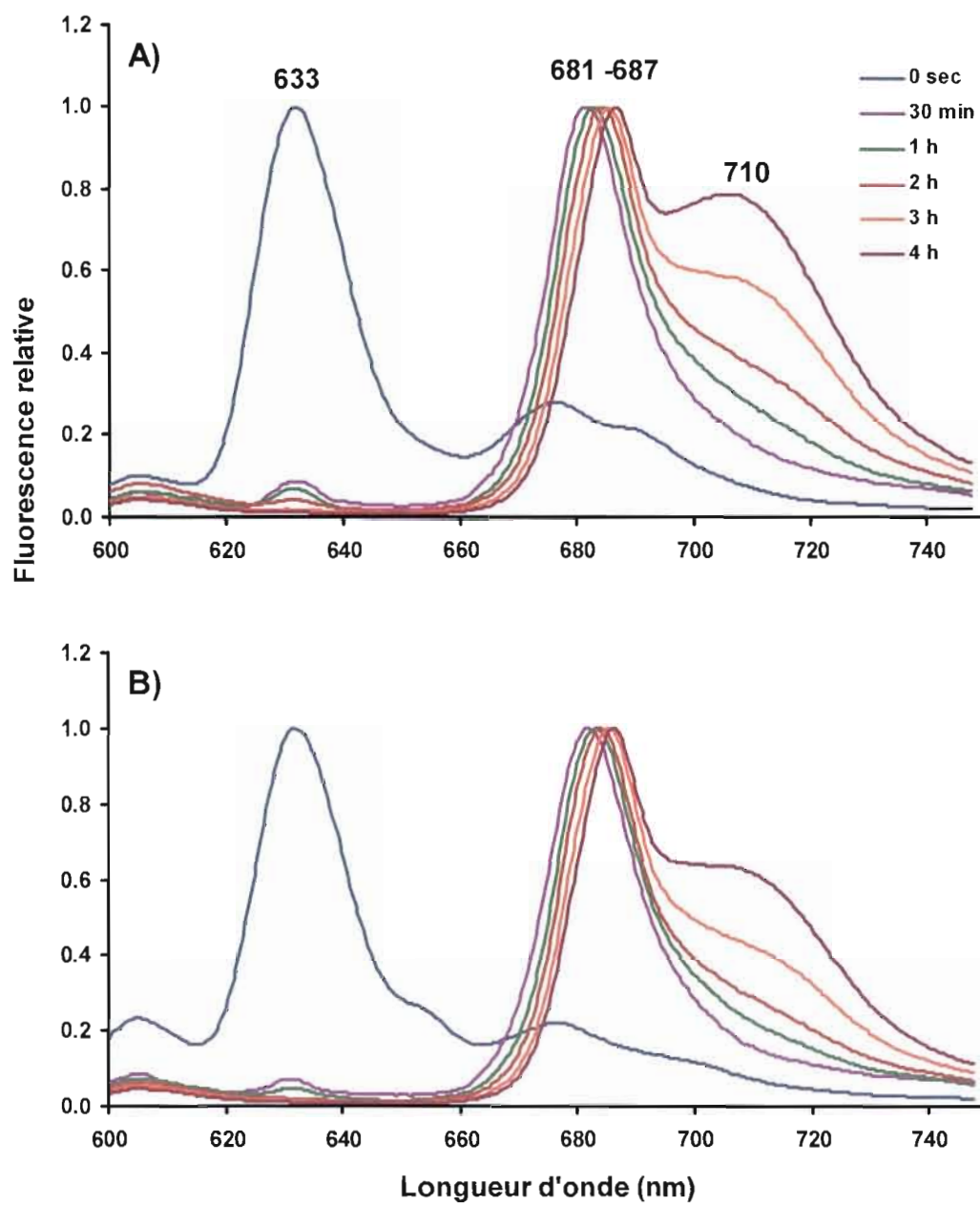


Figure 7.18 Formation de photosystèmes chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1168 y-1) en présence de (A) 0 et (B) 100 μM d'ions cadmium suite à différents temps d'exposition à une lumière de 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (normalisé au maxima) ($n=1$).

De plus, les résultats de notre étude montrent un léger décalage pour la longueur d'onde correspondante au maxima de la bande de la chlorophylle (Tableau 7.4). Le déplacement plus lent de cette bande indique un délai dans la formation de PSII (F695). Ce délai est aussi marqué par un retard dans la formation des complexes pigments-protéines associés au PSI (F710) (Tableau 7.5).

Tableau 7.4 Variation du maxima de la bande associée à la formation de la chlorophylle et du PSII.

Temps d'exposition à la lumière (h)	Maxima Chl-PSII (nm)	
	Concentrations de CdCl ₂ (μM)	
	0	100
0,5	681,5	681,5
1	683,0	683,0
2	684,5	684,0
3	685,5	685,5
4	686,5	686,0

Tableau 7.5 Changements dans le ratio de la formation du PSI exprimé par F685/F710 associés à la fluorescence de la chlorophylle et du PSI respectivement.

Temps d'exposition à la lumière (h)	Ratio F685/F710	
	Concentrations de CdCl ₂ (μM)	
	0	100
0,5	5.13	5.85
1	3.48	4.34
2	2.68	3.44
3	1.75	2.36
4	1.25	1.59

7.3.4 Discussion sur les effets du cadmium dans la biosynthèse de la chlorophylle

Les résultats obtenus montrent un retard dans la formation des complexes pigments-protéines chez *C. reinhardtii* en présence de cadmium. D'abord, nous avons observé un retard dans le déplacement de la bande associée à la Chl et au PSII chez *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de cadmium. En effet, le déplacement de la bande 683 à 688 nm indique un assemblage progressif du PSII (White et Hooper, 1994). Ensuite, nous avons montré qu'il y a un retard dans l'apparition de la bande à 710 nm chez cette algue en présence de cadmium. La bande à 710 nm représente un mélange de LHCI libre (708 nm) et de LHCI liés aux PSI (715 nm) (Gershoni et Ohad, 1980; Delepelaire et Woolman, 1985).

Cet effet des ions cadmium sur la formation des photosystèmes et des complexes pigments-protéines peut être causé par de multiples facteurs. En effet, nous avons observé une inhibition de la phototransformation de la PChlide en Chlide en présence de cadmium. Cette inhibition causée par le cadmium crée un retard dans la formation de chlorophylle, ce qui ralentit la formation de complexes chlorophylle-protéines tels les photosystèmes et les antennes collectrices de lumière. Donc, le délai de l'apparition des bandes associées aux photosystèmes peut être causé par l'inhibition de l'activité enzymatique de POR.

L'interférence des ions métalliques dans les étapes d'intégration de la chlorophylle au niveau des photosystèmes et des antennes collectrices de lumière est une autre possibilité. Cette hypothèse a été retenue dans l'étude des effets du cuivre sur la formation des photosystèmes chez l'orge (Caspi et *al.*, 1999). Cette hypothèse fut retenue en raison de la même concentration de chlorophylle pour le témoin et pour les plantes exposées au cuivre. Donc, il est possible que le cadmium ait le même effet et qu'il inhibe l'intégration de la chlorophylle dans les photosystèmes.

Finalement, le délai de quelques heures pour la formation des photosystèmes suite à l'illumination reflète le temps requis pour l'induction des gènes liés au développement du chloroplaste (Hooper et *al.*, 1982; Malnoe et *al.*, 1988; Anandan et *al.*, 1993). Ainsi, l'étape

limitante dans le processus de formation de la membrane des thylacoïdes est la synthèse des protéines dont plusieurs se lient à la chlorophylle (White et Hooper, 1994). Les étapes subséquentes, telles l'intégration des protéines aux membranes et l'association avec la chlorophylle sont plus rapides que l'induction de l'expression génique (White et Hooper, 1994). Donc, le cadmium pourrait interférer dans la synthèse de l'ensemble des protéines formant les photosystèmes et les antennes collectrices de lumière. Ceci expliquerait le retard de l'apparition des bandes correspondantes aux PSI et LHCI pour les cellules de *C. reinhardtii* exposées au cadmium.

Il serait intéressant d'étudier l'effet du cadmium sur l'expression des gènes codant pour les sous unités protéiques du PSII, PSI, LHCI, LHCII et POR. Cette approche mènerait vers la compréhension des mécanismes menant au délai de la formation des complexes pigments-protéines en présence de cadmium.

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS

Cette étude, comporte deux volets. Le premier avait pour but l'investigation des effets toxiques du cadmium sur l'activité photosynthétique et l'étude du rôle de protection de la paroi cellulaire. La seconde partie porte sur les effets du cadmium dans le processus de synthèse de la chlorophylle et de la formation des complexes pigments-protéines lors du verdissement. Nous avons utilisé les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* puisqu'elle est un excellent bioindicateur de la toxicité des métaux lourds (Hanikenne, 2003). De plus, l'existence de plusieurs souches mutantes augmente l'attrait pour cette algue unicellulaire dans la recherche en biochimie végétale.

Dans la première partie, nous avons montré que le cadmium diminue la croissance et la viabilité des cellules. De plus, après 48 heures d'exposition au cadmium, une importante synthèse de groupements thiols a été observée. Ces effets toxiques étaient plus prononcés pour les cellules sans paroi cellulaire. Par la suite, en utilisant la fluorescence chlorophyllienne, nous avons montré que le cadmium inhibe le transport d'électrons du côté donneur du PSII en affectant le complexe de dégagement d'oxygène. Le transport d'électron linéaire vers le PSI est également affecté. Ainsi, les paramètres photosynthétiques les plus sensibles furent F_o/F_v et qE_{max} avec des EC_{50} de 2 et 2,5 μM respectivement pour les cellules sans paroi cellulaire exposées pendant 48 heures au cadmium. En effet, les paramètres photosynthétiques ont montré une toxicité du cadmium beaucoup plus grande pour les cellules sans paroi cellulaire. Ces cellules sont donc un bioindicateur plus sensible de la toxicité des métaux. Ceci s'explique par l'absence de groupements chélateurs qui sont responsable de l'adhérence des ions métalliques au niveau de la paroi cellulaire. Il y a moins d'ions cadmium qui adhèrent à la cellule et il y a une augmentation du cadmium intracellulaire. Une fois à l'intérieur de la cellule, le cadmium se lie aux groupements des acides aminés (SH, COO⁻) en plus d'induire la formation d'ERO. Ces effets toxiques mènent à une diminution de l'activité enzymatique et de l'activité photosynthétique.

La fluorescence des pigments photosynthétiques et leurs précurseurs nous a permis d'étudier les effets du cadmium sur le processus de la synthèse de la chlorophylle et du développement de l'appareil photosynthétique. Notre travail a montré que le cadmium inhibe l'activité de POR qui consiste à phototransformer la PChlide en Chlide. De plus, un retard dans l'apparition de la bande associée au PSI indique un effet du cadmium dans le développement de l'appareil photosynthétique.

Ce travail a apporté une nouvelle dimension à la recherche en utilisant *Chlamydomonas reinhardtii* comme modèle d'étude de la synthèse de la chlorophylle en présence de métaux lourds. Cette espèce d'algue requiert des conditions de culture spéciales mais offre des avantages dans la recherche en toxicologie environnementale. En effet, il s'agit d'un modèle unicellulaire qui se reproduit rapidement et facilement en plus d'être un bioindicateur sensible à la présence de métaux.

RÉFÉRENCES

- Adonaylo, V. N. et P.I. Oteiza. 1999. «Lead intoxication: Antioxidative defense and oxidative damage in rat brain ». *Toxicology*, vol. 135, p. 77–85.
- Alia, S., P.P. Saradhi et P. Mohanty. 1997. « Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage ». *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 38, p. 253–257.
- Alloway, B.J. 1995. *Heavy Metals in Soils*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 339 p.
- Anandan, S., D.T. Morishige et J.P. Thorner. 1993. « Light induced biogenesis of light harvesting complex I (LHCI) during chloroplast developement in barley (*Hordeum vulgare*) ». *Plant Physiol.*, vol. 101, p. 227-236.
- Ananyev, G., L. Zaltsman, C. Vasko et G.C. Dismukes. 2001. « The inorganic biochemistry of photosynthetic oxygen evolution/water oxidation ». *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, vol. 1503, p. 52–68.
- Anderson, J. M. et B. Andersson. 1982. «The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization ». *Scientific American*, vol. 330, p. 70-74.
- Babcock, GT. 1987. «The photosynthetic oxygen-evolving process ». In *Photosynthesis* Ed. J. Ames, Vol. 15, pp. 125-58. Amsterdam: Elsevier.
- Baroli, I., A.D. Do, T. Yamane, et K.K. Niyogi. 2003. « Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress ». *Plant Cell*, vol. 15, p. 992-1008.

- Baum, J.A. et J.G. Scandalios. 1979. « Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutase in maize ». *Differentiation*, vol. 13, p. 133-141.
- Benson, A.A. et M. Calvin. 1950. « Carbon dioxide fixation by green plants ». *Ann. Rev. Plant Physiol.*, vol. 1, p. 25-40.
- Bernier, M., R. Popovic, et R. Carpentier. 1993. « Mercury inhibition of photosystem II ». *FEBS Lett.*, vol. 32, p. 19-23.
- Bernier, M. et R. Carpentier. 1995. « The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II ». *FEBS Lett.*, vol. 360, p. 251-254.
- Berska, J., B. Mysliwa-Kurdziel et K. Strzalka. 2001. « Transformation of protochlorophyllide in chlorophyllide in wheat under heavy stress metal ». In *Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis (Queensland, Australia, 18-23 août 2001)* p. S2-015.
- Björkman, O. et B. Demmig. 1987. « Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins ». *Planta*, vol. 170, p. 489-504.
- Böddi B., M. Ryberg et C. Sundqvist. 1992. « Identification of four universal protochlorophyllide forms in dark-grown leaves by analyses of the 77 K fluorescence emission spectra ». *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 53, p. 389-401.
- Böddi, B., B. McEwen, M. Ryberg et C. Sundqvist. 1994. « Protochlorophyllide forms in non-greening epicotyls of dark-grown pea (*Pisum sativum*) ». *Physiol. Plant.*, vol. 92, p. 160-170.

- Böddi, B., A.R. Oravecz et E. Lehoczki. 1995. « Effect of cadmium on organization and photoreduction of protochlorophyllide in dark-grown leaves and etioplast inner membrane preparations of wheat ». *Photosynthetica*, vol. 31, p. 411–420.
- Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu et D Inzé. 1994. « Superoxide dismutase in plants ». *Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 13, p. 199–218.
- Brennan, R.J., et R.H. Schiestl. 1996. « Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast ». *Mutat. Res.*, vol. 356, p. 171–178.
- Briantais, J.M., C. Vernotte, M. Picaud et G.H. Krause. 1979. « A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts ». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 548, p.128-138.
- Briantais, J.-M., C. Vernotte, G. H. Krause et E. Weis. 1986. « Chlorophyll a fluorescence of higher plants: Chloroplasts and leaves ». In *Light emission by plants and bacteria*, p. 539-583. Academic Press, New-York.
- Buchanan, B.B, Gruissem W. et Jones R.L. 2001. « Part 3 : Energy Flow » Dans *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, p.568-728, Rockville, Maryland, USA, American Society of Plant Physiologist.
- Buchet, J.P., H. Roels, A. Bernard et R. Lauwerys. 1980. « Assessment of renal-function of workers exposed to inorganic lead, cadmium, or mercury-vapor ». *J. Occup. Environ. Med.*, vol. 22, p. 741–750.
- Buschmann, C. 1995. « Variation of the quenching of chlorophyll fluorescence under different intensities of the actinic light in wildtype plants of tobacco and in an Aurea mutant deficient of light-harvesting-complex ». *J. Plant Physiol.*, vol. 145, p. 245-252.

- Butler, W. L. et M. Kitajima. 1975. « A tripartite model for chloroplast fluorescence ». Proceedings, 3rd International Congress on Photosynthesis, p. 13-24.
- Butler, W.L. 1977. In A Trebst, M. Avron Eds. *Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthesis I*. Vol. 5, p. 149-167, Springer, Berlin.
- Calvin, M. et P. Massini. 1952. « The path of carbon in photosynthesis. » *Experientia*. vol. 8, p. 445-457.
- Calvin, M. et J.A. Bassham. 1962. Dans : *The photosynthesis of carbon compounds*. pp. 1-127. Benjamin, New York.
- Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson, and G. Öquist. 1998. « Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation ». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, p.667-683.
- Campbell, N. A. 1995. « La Photosynthèse ». Dans *Biologie*, p. 199-220, Montréal : ERPI.
- Caspi, V., M. Droppa, G. Horvath, S. Malkin, J.B Marder et V.I. Raskin. 1999. « The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley Leaves ». *Photosynth. Res.*, vol. 62, p. 165–174.
- Cervantes, C., J. Campos-Garcia, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H., Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzman et R. Moreno-Sanchez. 2001. «Interactions of chromium with microorganisms and plants ». *FEMS Microb. Rev.*, vol. 25, p. 335–47.
- Chandlee, J.M., A. Tsaftaris et J.G. Scandalios. 1983. « Purification and partial characterization of three genetically defined catalases of maize ». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, vol. 81, p. 4903-4914.

- Chapman, P.M., HE. Allen, K. Godtfredsen et MN. Zy Graggen. 1996. « Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals ». *Environ. Sci. Technol.*, vol. 30, p. 42–48.
- Chaoui, A., S. Mazhoudi, M.H. Ghorbal, et E.E Ferjani. 1997. « Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ». *Plant Sci.*, vol. 127, p. 139–147.
- Chen, L. M. et C.H. Kao. 1999. « Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxydation ». *Botanical Bulletin of Academica Sinica*, vol. 40, p. 283–287.
- Cobbett, C. et P. Goldsbrough. 2002. « Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 53, p. 159–182.
- Collard, J.M., et R.F. Matagne. 1990. « Isolation and Genetic Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Strains Resistant to Cadmium ». *Appl. and Environ. Microbiol.*, p. 2051–2055.
- Coppellotti, O. 1989. « Glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* cells exposed to copper and cadmium ». *Comp. Biochem. and Physiol.*, vol. 94, p. 35–40.
- Crist, D.R, R.H.Crist, J.R. Martin et J.R. Watson. 1994. « Ion exchange systems in proton-metal reactions with algal cell walls». *FEMS Microbiol Rev.*, vol. 14, p. 309–314.
- Delauney, A.J., et D.P.S. Verma. 1993. « Proline biosynthesis and osmoregulation in plants ». *Plant J.*, vol. 4, p. 215–223.

- Delepelaire, P. et F.A. Woolman. 1985. « Correlation between fluorescence and phosphorylation changes in thylakoid membrane of *Chlamydomonas reinhardtii* in vivo : a kinetic analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 809, p. 277-283.
- Delosme, R. 1967. « Étude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 143, p. 108-128.
- Demmig-Adams, B., K. Winter, A. Krüger et F.-C. Czygan. 1989. « Zeaxanthin and the induction and relaxation kinetics of the dissipation of excess excitation energy in leaves in 2% O₂, 0% CO₂ ». *Plant Physiol.*, vol. 90, p. 887-893.
- Demmig-Adams, B. 1990. « Carotenoids and photoprotection in plants : A role for the xanthophyll zeaxanthin ». *Biochim. Biophys. Acta*. vol. 1020, p. 1-24.
- Desi, I., L. Nagymajtenyi, et H. Schulz. 1998. « Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development ». *J. Appl. Toxicol.*, vol. 18, p. 63-70.
- Di Toppi, L.S., et R. Gabrielli. 1999. « Response to cadmium in higher plants ». *Environ. Exp. Bot.*, vol. 41, p. 105-130.
- Dudka, S., et D.C. Adriano. 1997. « Environmental impacts of metal or mining and processing: A review ». *J. Environ. Qual.*, vol. 26, p. 590-602.
- Duysens, L. N. M. et H. E. Sweers. 1963. « Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence ». In *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*, p. 353-372.: Japanese Society of Plant Physiologists, University of Tokyo Press, Tokyo.

- Faller, P. 2005. « Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1706, p. 158–164.
- Fay, R. M. et M.M. Mumtaz. 1996. « Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 1188 hazardous waste sites, using the Haz-Dat database ». *Food Chem. Toxicol.*, vol. 34, p. 1163–1165.
- Ferreira, K.N., T.M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber et S. Iwata. 2004. « Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center ». *Science*, vol. 303, p. 1831–1838.
- Force, L, C. Critchley, JJS. van Rensen. 2003. « New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants - 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test. *Photosynth. Res.*, vol. 78, p. 17-33.
- Foyer, C.H. 1993. « Ascorbic acid » In: Antioxydant in higher plants. R.G. Alsher, J.L. Hess Eds, p. 31-58. Boca Raton, USA, CRC Press.
- Foyer, CH. et J. Harbinson. 1994. « Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport ». In: *Causes of Photooxydative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. C.H. Foyer et P.M. Mullineux (eds.), p. 1-42. London, CRC Press.
- Foyer, C.H., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat, et I.M. Scott. 1997.. « Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling ». *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 241–254.
- Franck, F, et P. Mathis. 1980. « A short-lived intermediate in the photoenzymatic reduction of protochlorophyll(ide) into chlorophyll(ide) at a physiological temperature ». *Photochem. Photobiol.*, vol. 32, p. 799-803.

- Franck, F. 1993. « On the formation of photosystem II chlorophyll-proteins after a short light flash in etiolated barley leaves, as monitored by *in vivo* fluorescence spectroscopy ». *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 18, p. 35-40.
- Fridovich, I. 1986. « Superoxide dismutases ». *Adv. Enzymol.*, vol. 58, p. 61-69.
- Genty, B., J.-M. Briantais et N. R. Baker. 1989. « The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Geoffroy, L., D. Dewez, G. Vernet et R. Popovic. 2003. « Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 45, p. 445-452.
- Gershoni, J.M. et I. Ohad. 1980. « Chloroplast-cytoplasmic interrelations involved in chloroplast developement in *Chlamydomonas reinhardtii* y1 : effect of selective depletion of chloroplast translate ». *J. Cell Biol.*, vol. 86, p. 124-131.
- Govindjee et R. Govindjee. 1974. « Primary Events in Photosynthesis ». *Scientific American*, vol. 231, p. 68-82.
- Govindjee, R., T. Kambara, et W. Coleman. 1985. « The electron donor side of photosystem II: the oxygen evolving complex ». *Photochem Photobiol.*, vol. 42, p. 187-210.
- Govindjee. 1995. « Sixty-three years since Kautsky : chlorophyll a fluorescence ». *Aust. J. Plant. Physiol.*, vol. 22, p. 131-160.
- Griffiths, W.T, T. McHungh et R.E. Blankenship. 1996. « The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase ». *FEBS Lett.*, vol. 398, p. 235-238.

- Guisé, B., A. Srivastava et R. J. Strasser. 1995. « The polyphasic rise of the chlorophyll *a* fluorescence (O-K-J-I-P) in heat-stressed leaves ». *Archs Sci. Genève*, vol. 48, p. 147-160.
- Haber, F. et J. Weiss. 1934. « The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts ». *Proc. Roy. Soc.*, vol. 147, p. 332-351.
- Hall, D.O. et K.K. Rao. 1994. *Photosynthesis*, New York, NY, USA: Cambridge University Press, 225 p.
- Halliwell, B. et J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3e éd., New York, Oxford University Press, 936 pp.
- Harbinson J. et E. Rosenqvist. 2003. « An Introduction to Chlorophyll Fluorescence ». In : *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. J.R. DeEll et P.M.A. Toivonen (eds.), p. 1-30. London, Kluwer Academic Publishers.
- Hanikenne, M. 2003. « *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance ». *New Phytologist*, vol. 159, p. 331-340.
- Harris, E.H. 1989. *The Chlamydomonas Source Book: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego, Academic Press, Inc., 789 p.
- Havaux, M., R. J. Strasser et H. Greppin. 1991. « A theoretical and experimental analysis of the QP and QN coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events ». *Photosynth. Res.*, vol. 27, p. 41-55.
- Haynes, R.J. 1980. « Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants ». *Bot. Rev.*, vol. 46, p. 75-79.

- Hellström L., C.G. Elinder, B. Dahlberg, M. Lundberg, L. Järup, B. Persson et O. Axelson. 2001. « Cadmium exposure and end-stage renal disease ». *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 38, p. 1001- 1008.
- Henmi, T., M. Miyao et Y. Yamamoto. 2004. « Release and Reactive-Oxygen-Mediated Damage of the Oxygen-Evolving Complex Subunits of PSII during Photoinhibition ». *Plant Cell Physiol.*, vol. 45, p. 243-250.
- Henningsen, K.W. 1970. « Macromolecular physiology of plastids. VI. Changes in membrane structure associated with shifts in the absorption maxima of the chlorophyllous pigments ». *J. Cell Sci.*, vol. 7, p. 587-621.
- Henningsen, K.W. et S.W. Thorne. 1974. « Esterification and spectral shifts of chlorophyllide in wild type and mutant seedlings developed in darkness ». *Physiol. Plant.*, vol. 30, p. 82-89.
- Hertwig, B., Steb, P. et Feierabend, J. 1992. « Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions ». *Plant Physiol.*, vol. 100, p. 1547-1553.
- Holtorf, H, S. Reinbothe, C. Reinbothe, B. Berezina et K. Apel. 1995. « Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley ». *Proc Natl Acad. Sci. USA.*, vol. 92, p. 3254–3258.
- Hooper, K.J., D.B. Marks, B.J. Keller, B.J. et M.M. Margulies. 1982. « Regulation and accumulation of the major thylakoid polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii* γ -1 at 25°C and 38°C ». *J. Cell Biol.*, vol. 95, p. 552-558.
- Hooper, K.J. 1984. *Chloroplasts*. New York, Plenum Press, 280 p.

- Horemans, N., C.H. Foyer et H. Asard. 2000. « Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane ». *Trends Plant Sci.*, vol. 5, 263–267.
- Horvath, G., J.B. Arellano, M. Droppa et M. Baron. 1998. « Alteration in photosystem II electron transport as revealed as thermoluminescence of Cu-poisoned chloroplasts ». *Photosynth. Res.*, vol. 57, p. 175-182.
- Hsu, B.-D. 1993. « Evidence for the contribution of the S-state transitions of oxygen evolution to the initial phase of fluorescence induction ». *Photosynth. Res.*, vol. 36, p. 81-88.
- Hu, S., K.W.K. Lau et M. Wu. 2001. « Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant Science*, vol. 161, p. 987–996.
- Ikeuchi, M. et S. Murakami. 1983. « Separation and characterization of prolamellar bodies and prothylakoids from squash etioplasts ». *Plant Cell Physiol.*, vol. 24: p. 71-80.
- Ilangovan, K., R.O. Canizares-Villanueva, S. Gonzalez Moreno et D. Voltolina. 1998. « Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* ». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 60, p. 936-943.
- Inoue, Y, T. Kobayashi, T. Ogawa et K. Shibata. 1981. « A short lived intermediate in the photoconversion of a protochlorophyllide to chlorophyllide *a* ». *Plant Cell Physiol.*, vol. 22, p. 197–204.
- Jegerschöld, C., J.B. Arellano, W.P. Schroder, P.J. van Kan, M. Baron et S. Styring. 1995. « Copper (II) inhibition of electron transfer through Photosystem II studied by EPR spectroscopy ». *Biochemistry*. vol. 34, p. 12747-12754.
- Joliot, P., I.G. Barbier, R. Chabaud. 1969. « Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II ». *Photochem. Photobiol.*, vol. 10, p. 309-329.

- Joliot P. et A. Joliot. 1978. « La photosynthèse ». *La Recherche*, vol. 9, p. 331-338
- Jordanova, A., A. Strezov, M. Ayranov, N. Petkov, et T. Stoilova. 1999. « Heavy metal assessment in algae, sediments and water from the Bulgarian Black Sea Coast ». *Water Sci. Tech.*, vol. 39, p. 207-12.
- Juneau, P. et R. Popovic. 1999. « Evidence for the rapid phytotoxicity and stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application ». *Ecotoxicol.*, vol. 8, p. 449-455.
- Juneau, P., A. El Berdey et R. Popovic. 2002. « PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 42, p. 155-164.
- Juneau, P., B.R. Green, et P.J. Harrison. 2005. « Simulation of Pulse Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects ». *PHOTOSYNTHETICA*, vol. 43, p. 75-83.
- Jupin, H. et A. Lamant. 1999. *La photosynthèse*. Paris, Dunod, 268 p.
- Kahle, H. 1993. « Response of roots of trees to heavy metals ». *Environ. Exp. Bot.*, vol. 33, p. 99-119.
- Karukstis, K., 1991. « Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus ». In *Chlorophyll*, Sheer, H. Ed. P. 769-795. London, CRC Press.
- Kautsky, H. et A. Hirsch. 1931. « Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation ». *Naturwissensch.*, vol. 19, p. 964.

- Klimov, V.V., E. Dolan et B. Ke. 1981. « Functions of pheophytin, plastoquinone, iron and carotenoids in plant photosystem 2 reaction centers ». *Biofizika*, vol. 26, p. 802-808.
- Kola, H., L.M. Laglera, N. Parthasarathy et L. Wilkinson. 2004. « Cadmium Adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its Interaction with the Cell Wall Proteins ». *Environ. Chem.*, vol. 1, p. 172-179.
- Kono, Y. et I. Fridovich. 1982. « Superoxide radical inhibits catalase ». *J Biol. Chem.*, vol. 257, p. 5751-5754.
- Kramer, D.M., G. Johnson, O. Kiirats et G.E. Edwards. 2004. « New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes ». *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Krause, G. H. et E. Weis. 1984. « Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals ». *Photosynth. Res.*, vol. 5, p. 139-157.
- Krause, G.H. et E. Weis 1991. « Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics ». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, vol. 42, p. 313-349.
- Krüger, G. H. J., M. Tsimilli-Michael et R.J. Strasser. 1997. « Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in Camellia leaves ». *Physiol. Plant.*, vol. 101, p. 265-277.
- Küpper, H., F. Küpper et M. Spiller. 1998. « *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants ». *Photosynth. Res.*, vol. 58, p.123-133.
- Laube, VM., CN. McKenzie, et DJ. Kushner. 1980. « Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green and a green alga ». *Can. J. Microbiol.*, vol. 26, p. 1300-1311.

- Lazar, D. 2006. « The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light ». *Funct. Plant Biol.*, vol. 33, p. 9-30.
- Lebedev, N. et M.P. Timko. 1998. « Protochlorophyllide photoreduction ». *Photosynth. Res.*, vol. 58 p. 5-23.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson et M.M. Cox. 1994. *Principes de biochimie*, 2^e éd., Paris, France, Éditions Médecine-Sciences/Flammarion, 742 p.
- Lehoczy, E., L. Szabo, S. Horvath, P. Marth, et I. Szabados. 1998. « Cadmium uptake by lettuce in different soils ». *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 29, p. 1903-1912.
- Leipner, J., A. Basilides, P. Stamp et Y. Fracheboud. 2000. « Hardly increased oxidative stress after exposure to low temperature in chilling-acclimated and non-acclimated maize leaves ». *Plant Biol.*, vol. 2, p. 243-252.
- Lemaire, S.D., E. Keryer, M. Stein, I.I. Schepens, E. Issakidis-Bourguet, C. Gerard-Hirne, M. Miginiac-Maslow et J.P. Jacquot. 1999. « Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant Physiol.*, vol. 120, p. 773–778.
- Lemaire, S.D., M. Miginiac-Maslow et J.P. Jacquot. 2002. « Plant thioredoxin gene expression: control by light, circadian clock, and heavy metals ». *Meth. Enzymol.*, vol. 347, p. 412–421.
- Levine, A. 1999. « Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants ». In: *Plant responses to environmental stresses. From phytohormones to genome reorganization*, ed. H. R. Lerner, p. 248-266. New York: Marcel Dekker.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. « Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes ». *Meth. Enzymol.*, vol. 148, p. 350-382.

- Lichtenthaler, H.K. 1996. « Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants ». *J. Plant Physiol.*, vol. 148, p. 4-14.
- Lin, J.N. et C.H. Kao. 1998. « Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves ». *Bot. Bull. Acad. Sin.*, vol. 39, p. 161-165.
- Lledias, F., P. Rangel et W. Hansberg. 1998. « Oxidation of catalase by singlet oxygen ». *J. Biol. Chem.*, vol. 273, p. 10630-10637.
- Macfarlane, G.R. et M.D. Burchett. 2001. « Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the greymangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh ». *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 42, p. 233-240.
- Macfie, S.M. et P.M. Welbourn. 2000. « The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 39, p. 413-419.
- Mallich, N. et F.H. Mohn. 2003. « Use of chlorophyll fluorescence in metal stress research: a case study with the green microalgae *Scenedesmus* ». *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, vol. 55, p. 64-69.
- Maln e, P., S.P. Mayfield et J.D. Rochaix. 1988. « Comparative analysis of the biogenesis of photosystem II in the wild type and y-1 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Cell Biol.*, vol. 106, p. 609-616.
- Martin, B. et D.R. Ort. 1982. « Insensitivity of Water-Oxidation and Photosystem II Activity in Tomato to Chilling Temperatures ». *Plant Physiol.*, vol. 70, p. 689-694.
- Mathis, P. et G. Paillotin. 1981. « Primary processes of photosynthesis ». In: *The biochemistry of plants*, ed. M.D. Hatch et N.K. Boorman, p. 97-161. New York: Academic Press.

- Maxwell, K. et G.N. Johnson. 2000. « Chlorophyll fluorescence - a practical guide ». *J. Exp. Bot.*, vol. 51, p. 659-668.
- McKersie, B.D. et Y.Y. Leshem. 1994. *Stress and stress coping in cultivated plants*. London: Kluwer Academic Publishers, 260 p.
- Mehta, S.K. et J.P. Gaur. 1999. « Heavy-metal-induced praline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris* ». *New Phytol.*, vol.143, p. 253–259.
- Mendoza-Cozatl, D., S. Devars, H. Loza-Tavera et R. Moreno- Sanchez. 2002. « Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis* ». *Physiol. Plant.*, vol. 115, p. 276–283.
- Miller, K. 1979. « La membrane photosynthétique ». *Pour la Science*, vol.2, p. 27-39
- Moïr, A.M. et I. Thornton. 1989. « Lead and cadmium in urban allotment and garden soils and vegetables in the United-Kingdom ». *Environ. Geochem. Health*, vol. 11, p. 113–119.
- Mosulén, S., M.J. Dominguez, J. Vigara, C. Vilchez, A. Guiraum et J.M. Vega. 2003. « Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation ». *Biomol. Eng*, vol. 20, p. 199-203.
- Müller, P., X.P. Li et K.K. Niyogi. 2001. « Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy ». *Plant Physiol.*, vol. 125 p. 1558-1566.
- Munday, JCM. et Govindjee. 1969. « Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll A in vivo. IV. The effect of preillumination on the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa* ». *Biophys. J.*, vol. 9, p. 1-21.

- Mysliwa-Kurdziel, B. et K. Strzalka. 2005. « Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe (III) on early steps of deetiolation process in wheat : fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide ». *Agriculture Ecosystems & Environment*, vol. 106, p. 199-207.
- Nies, D.H. 1999. « Microbial heavy-metal resistance ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 51, p. 730-750.
- Nishiyama, Y., H. Yamamoto, S.I. Allakhverdiev, M. Inaba, A. Yokota et N. Murata. 2001. « Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery ». *EMBO J.*, vol. 20, p. 5587-5594
- Nogawa, K., et T. Kido. 1993. « Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology ». *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 65, p. 43-46.
- Novacova, M., E. Matejova et D. Sofrova. 2004. « Cd²⁺ effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.) ». *Photosynthetica*, vol. 42, p. 425-430.
- Nriagu, J.O., et J.M. Pacyna. 1988. « Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace-metals ». *Nature*, vol. 333, p. 134-139.
- Okamoto, O. K. Et P. Colepicolo. 1998. « Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* ». *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 119, p. 67-73.
- Oliveira, J., M. Oliva, J. Cambraia et V. Vanegas. 1994. « Absorption, accumulation and distribution of cadmium by two soybean cvs ». *Revista Brasileira. Fisiologia Vegetal*, vol. 6, p. 91-95.
- Oliver, R.P. et W.T. Griffiths. 1982. « Pigment-protein complexes of illuminated leaves ». *Plant Physiol.*, vol. 70, p. 1019-1025.

- Öquist, G. et W. S. Chow. 1992. « On the relationship between the quantum yield of photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and the quantum yield of CO₂-dependent O₂ evolution ». *Photosynth. Res.*, vol. 33, p. 51-62.
- Ouariti, O., N. Boussama, M. Zarrouk, A. Cherif et M.H. Ghorbal. 1997. « Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids ». *Phytochemistry*, vol. 45, p. 1343–1350.
- Ouzounidou, G., M. Moustakas et R. Lannoye. 1995. « Chlorophyll fluorescence and photoacoustic characteristics in relation to changes in chlorophyll and Ca²⁺ content of a Cu-tolerant *Silene compacta* ecotype under Cu treatment ». *Physiol Plant.*, vol. 93, p. 551–557
- Papageorgiou, G. 1975. « Chlorophyll fluorescence : An intrinsic probe of photosynthesis ». Dans *Bioenergetics of photosynthesis*, ed. Govindjee, p. 319-371, New-York, USA: Academic Press, Inc.
- Pfündel, E. 1998. « Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence ». *Photosynth. Res.*, vol. 56, p. 185-195.
- Pinto, E., T.C.S. Sigaud-Kutner, M.A.S. Leitao, O.K. Okamoto, D. Morse et P. Colepicolo. 2003. « Heavy Metal- Induced Oxidative Stress in Algae ». *J. Phycol.*, vol. 39, p. 1008-1018.
- Popovic, R., D. Dewez et P. Juneau. 2003. «Applications of Chlorophyll Fluorescence in Ecotoxicology: Heavy Metals, Herbicides and Air Polluants ». In *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, ed. J.R. DeEll et P.M.A. Toivonen, p.151-184. Boston: Kluwer Academic Publishers.

- Prasad, M.N., K. Drej, A. Skawinska, K. Strzalka. 1998. « Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15) ». *Bull. of Environ. Contam. and Toxicol.*, vol. 60, p. 306–311.
- Quinlan, G. J., B. Halliwell, C.P. Moorhouse et J.M.C. Gutteridge. 1988. « Action of lead (II) and aluminium (III) ions on ironstimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 962, p. 196–200.
- Ralph, P.J. et MD. Burchett. 1998. « Impact of petrochemicals on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence ». *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 36, p. 429-436.
- Rashid, A. et R. Popovic. 1990. « Protective role of CaCl_2 against Pb^{2+} inhibition in Photosystem II ». *FEBS Lett.*, vol. 271, p. 181-184.
- Rashid, A., E.L. Camm et A.K. Ekramoddoullah. 1994. « Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complex of photosystem II ». *FEBS Lett.*, vol. 350, p. 296-298.
- Raven, J.A., M.C.W. Evans et R. Korb. 1999. « The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O_2 -evolving organisms ». *Photosynth Res.*, vol. 60, p. 111–149.
- Rawn, J.D. 1990. « La photosynthèse » Dans *Traité de biochimie*, p. 489-532, Bruxelles, Belgique : De Boeck-Wesmael.
- Robins, D.B. et A.W. Bedo. 1994. « Quantitative determination of particle concentrations in experimental and marine environmental samples ». *Cytometry*, vol. 17, p. 179-184.

- Robinson, N. J., P.E. Urwin, P.J. Robinson, et P.J. Jackson. 1994. « Gene expression in relation to metal toxicity and tolerance ». In *Stress Induced Gene Expression in Plants*, ed. A.J. Basra, p. 209-248. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Rohaček, K. 2002. « Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships ». *Photosynthetica*, vol. 40, p. 13-29.
- Rosakis, A. et W. Köster. 2004. « Transition metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Genomic sequence analysis ». *Res. Microbiol.*, vol. 155, p. 201-210.
- Rüdigger et Schoch. 1988. « Chlorophylls ». In *Plant Pigments*, ed. T.W. Goodwin, p. 1-59. New-York: Academic Press.
- Ryberg, M., et K. Dehesh. 1986. « Localization of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in dark-grown wheat (*Triticum aestivum*) by immunoelectron microscopy before and after transformation of the prolamellar bodies ». *Physiol. Plant.*, vol. 66, p. 616-627.
- Ryberg, M. et C. Sundqvist. 1988. « The regular ultrastructure of isolated prolamellar bodies depends on the presence of membrane-bound NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase ». *Physiol. Plant.*, vol. 73, p. 218-226
- Samson, G. et R. Popovic. 1988. « Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants ». *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 16, p. 272-278
- Sandalio, L.M., H.C. Dalurzo, M. Gómez, M.C. Romero-Puertas, et L.A. del Río .2001. « Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants ». *J. Exp. Bot.*, vol. 52, p. 2115-2126.

- Santel, H.J. et K. Appel. 1981. « The effect of light on NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase ». *Eur. J. of Biochem.*, vol. 120, p. 95-103.
- Scandalios, J.G. 1994. « Regulation and properties of plant catalases ». In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, ed. C.H. Foyer et H. Mullineaux, p. 275-315. Boca Raton: CRC Press.
- Schat, H., S.S. Sharma et R. Vooijs. 1997. « Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris* ». *Physiol. Plant.*, vol. 101, p. 477-482.
- Schoch, S., M. Helfrich, B. Wiktorsson, C. Sundqvist, W. Rudiger et M. Ryberg. 1995. « Photoreduction of zinc protoporphyrinide *b* with NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase from etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) ». *Eur. J. Biochem.*, vol. 229, p. 291-298.
- Schreiber, U., U. Schliwa et W. Bilger. 1986. « Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer ». *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Schützendübel, A., P. Schwanz, T. Teichmann, K. Gross, R. Langenfeld-Heyser, D.L. Godbold et A. Polle. 2001. « Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots ». *Plant Physiol.*, vol. 127, p. 887-898.
- Segal, A.W. et A. Abo. 1993. « The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes ». *Trends Biochem. Sci.*, vol. 18, p. 43-47.
- Shah, K., et R.S. Dubey. 1998. « Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: Role of proline as a possible enzyme protectant ». *Biol. Plant.*, vol. 40, p. 121-130.

- Shibata, K. 1957. « Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves ». *J. Biochem.*, vol. 44, p. 147-173.
- Shora, H.M. 2003. « Activities of Antioxidative Enzymes and Senescence Detached *Cucurbita pepo* Under Cu and Oxidative Stress by H_2O_2 ». *Moscow University Chemistry Bulletin*. vol. 44, p. 66-71.
- Steffens, J. C. 1990. « Heavy metals stress and the phytochelatin response ». In *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, ed. R.G. Alscher et J.R. Cumming, p. 377-394. New York: Wiley-Liss.
- Stobart, A.K., W.T. Griffiths, I. Ameen-Bukhari et R.P. Sherwood. 1985. « The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley ». *Physiol.Plant.*, vol. 63, p. 293-298.
- Stoeva, N. et T. Bineva. 2003. « Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in as contaminated soil ». *Bulg. J. Plant Physiol.*, vol. 29, p.87-95.
- Stohs, S.J., D. Bagchi, E. Hassoun et M. Bagchi. 2000. « Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions ». *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 19, p. 201-213.
- Strasser, R. J. et Govindjee. 1991. « The Fo and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae ». In *Regulation of chloroplast biogenesis*, ed. J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, p. 423-426. New York: Plenum Press.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. « Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria ». *Photobiochem. Photobiophys.*, vol. 61, p. 32-42.
- Strasser, R. J. et Tsimilli-Michael, M. 1998. « The JIP-Test as a tool for the detection and quantification of stress in sustainable agriculture ». In: *Sustainable Agriculture for*

Food, Energy and Industry - Strategies towards Achievement, ed. N. El Bassam, R. K. Behl et B. Prochnow, p.133-139, London: James & James Science Publishers.

Strasser, R.J., H. Dau, L. Heinze, et H. Senger. 1999. « Comparison of light induced and cell cycle dependant changes in the photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus* ». *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 217-227.

Sueoka, N., K.S. Chiang et J.R. Kates. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.*, vol. 25, p. 44-67.

Sundqvist, C. et C. Dahlin. 1997. « With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes ». *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 748-759

Tanaka, A. et H. Tsuji. 1985. « Appearance of chlorophyll-protein complexes in greening barley seedlings ». *Plant Cell Physiology.*, vol. 26, p. 893-902.

Torricelli, E., G. Gorbi, B. Pawlik-Skowronska, S.L. di Toppi et M.G. Corradi. 2004. « Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae) ». *Aquat. Toxicol.*, vol. 68, p. 315-323.

Tsuritani, I., R. Honda, M. Ishizaki, Y. Yamada et M. Nishijo. 1996. « Ultrasonic assessment of calcaneus in inhabitants in a cadmium-polluted area ». *J. Toxicol. Environ. Health*, vol. 48, p. 131-140.

Van Camp, W., H. Willekens, C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, P. Reupold-Popp, H. Sanderman et C. Langebartels. 1994. « Elevated Levels of Superoxide Dismutase Protect Transgenic Plants Against Ozone Damage ». *Bio/Technology*, vol. 12, p. 165-168.

- Verma, D.P.S. 1999. « Osmotic stress tolerance in plants: Role of praline and sulfur metabolisms ». In *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, ed. K. Shinozaki et K. Yamaguchi-Shinozaki, p. 153-168. Austin, TX: R.G. Landers.
- Voigt, J. 1988. « The lithium-chloride-soluble cell-wall layers of *Chlamydomonas reinhardtii* contain several immunologically regulated glycoproteins ». *Planta*, vol. 173, p. 373-384.
- Walker, D.A. 1981. « Secondary fluorescence kinetics of spinach leaves in relation to the onset of photosynthetic carbon assimilation ». *Planta*, vol. 153, p. 273-278.
- Walker, D.A., M.N. Sivak, R.T. Prinsley et J.K. Cheeseborough. 1983. « Simultaneous measurements of oscillations in oxygen evolution and chlorophyll fluorescence in leaf pieces ». *Plant Physiol.*, vol. 73, p. 542-549.
- Walker, D. 1987. « Fluorescence ». Chap. In *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurement of photosynthesis*, p. 17-46. Sheffield: Oxgraphics, University of Sheffield.
- Wang, J. et V.P. Evangelou. 1995. « Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole ». In: *Handbook of plant and crop physiology*, ed. M. Pessarakli, p. 695-717. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Wang, S. et X. Shi. 2001. « Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis ». *Mol. Cell Biochem.*, vol. 222, p. 3-9.
- Wang, W.X. et R.C.H. Dei. 2001a. « Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P and Si) ». *Water Res.* vol. 35, p. 315-21.

- Wang, W.X. et R.C.H. Dei. 2001b. « Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton ». *Environ. Poll.* vol. 111, p. 233–240.
- Wang, W.Y. 1978. « Effect of dim light on the y-1 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant Physiol.*, vol. 61, p. 842-846.
- Wang, W.Y. 1979. « Photoconversion of Protochlorophyllide in the y-1 Mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant Physiol.*, vol. 63, p. 1102-1106.
- Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K. et Suzuki, T. 2003. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.*, vol. 134, p. 227–234.
- Weiss, E. et J. A. Berry. 1987. « Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 894, p. 198-208.
- Weier, T.E., R. D. Sjoland, et D. L. Brown. 1970. Changes Induced by Low Light Intensities on the Prolamellar Body of 8-Day, Dark-Grown Seedlings. *Am. J. Bot.*, vol. 57, p. 276-284.
- White, R.A., et J.K. Hooper. 1994. « Biogenesis of Thylakoid membranes in *Chlamydomonas reinhardtii* y1 ». *Plant Physiol.*, vol. 106, p. 583-590.
- Yruela, I., M. Alfonso, M. Baron et R. Picorel. 2000. « Copper effect on the protein composition of photosystem II ». *Physiol. Plant.*, vol. 110, p. 551-557.